

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of :  
Naoki MIDOH et al. : Attn: BOX PCT  
Serial No. NEW : Docket No. 2002\_0317A  
Filed March 6, 2002 :

CYCLIC DEPSIPEPTIDE SYNTHETASE AND  
GENE THEREOF, AND MASS PRODUCTION  
SYSTEM FOR CYCLIC DEPSIPEPTIDE  
[Corresponding to PCT/JP00/06103  
Filed September 7, 2000]

SUBMISSION OF DEPOSIT RECEIPTS

Assistant Commissioner for Patents,  
Washington, DC 20231

Sir:

There are submitted herewith copies of the receipts of the deposits of the three microorganisms referred to in the specification.

The deposits have been made under the International Budapest Treaty as accession number(s) FERM BP-2671, FERM BP-7253 and FERM BP-7254.

Respectfully submitted,  
Naoki MIDOH et al.

By Warren M. Cheek, Jr.  
Warren M. Cheek, Jr.  
Registration No. 33,367  
Attorney for Applicants

WMC/dlk  
Washington, D.C. 20006-1021  
Telephone (202) 721-8200  
Facsimile (202) 721-8250  
March 6, 2002

## BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

〔 特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約 〕

## RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い  
発行されるissued pursuant to Rule 7. 1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this  
page.

## 原寄託についての受託証

氏名 (名称) 明治製菓株式会社  
取締役社長 笹井 章  
寄託者 殿  
あて名 ㊤ 104  
東京都中央区京橋二丁目 4 番 16 号

## I. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

無孢子不完全菌 PF1022

(受託番号)

微工研条寄第 2671 号  
( FERM BP- 2671 )

## II. 科学的性質及び分類学上の位置

I 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- ☐ 科学的性質  
☐ 分類学上の位置

## III. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 元年 1月24日 (原寄託日) に受領した I 欄の微生物を受託する。

(平成 元年 1月24日に寄託された微工研菌寄第 P- 10504 号より移管)

## IV. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所

名称:

Fermentation Research Institute  
Agency of Industrial Science and Technology

所長事務代理 研究企画官 中村吉夫

Yoshihiro Nakamura, DIRECTOR GENERAL AD INTERIM,  
DIRECTOR, RESEARCH PLANT DIVISIONあて名: 日本国茨城県つくば市 1 番 3 号 (郵便番号 305)  
1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken  
305. JAPAN

平成 元年 (1989) 12月 4日

## BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

## RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブタベスト条約

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い  
発行される。

## 原寄託についての受託証

氏名 (名称) 明治製菓株式会社  
取締役社長 北里 一郎  
寄託者 殿  
あて名 〒  
東京都中央区京橋二丁目 4 番 16 号

1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) Escherichia coli / pPFsyn	(受託番号) FERM BP- 7253
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。  ■ 科学的性質 ■ 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 11 年 9 月 1 日 (原寄託日) に受領した 1 欄の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、平成 11 年 9 月 1 日 (原寄託日) に 1 欄の微生物を受領した。 そして、平成 12 年 7 月 31 日に原寄託よりブダベスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。 (平成 11 年 9 月 1 日に寄託された微工研菌寄第 P- 17541 号より移管)	
5. 国際寄託当局	
通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 名称: National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency for Industrial Science and Technology 所長 大箸 信 Dr. Shigenori Ohnishi Director-General あて名: 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305-8566) 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN 平成 12 年 (2000) 7 月 31 日	



特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブタペスト条約

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF  
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF  
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL  
DEPOSIT

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い  
発行される。

issued pursuant to Rule 7. 1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this  
page.

### 原寄託についての受託証

氏名 (名称) 明治製菓株式会社  
取締役社長 北里 一郎  
寄託者 殿  
あて名 〒  
東京都中央区京橋二丁目 4 番 16 号

1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) Escherichia coli / pPFsynN	(受託番号) FERM BP- 7254
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。  ■ 科学的性質 ■ 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 11 年 9 月 1 日 (原寄託日) に受領した 1 欄の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、平成 11 年 9 月 1 日 (原寄託日) に 1 欄の微生物を受領した。 そして、平成 12 年 7 月 31 日に原寄託よりブタペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。 (平成 11 年 9 月 1 日に寄託された微工研菌寄第 P- 17542 号より移管)	
5. 国際寄託当局	
通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 National Institute of Advanced Industrial Science and Technology 名称: Agency for Industrial Science and Technology 所長 大箸 信一 Dr. Shinichi Ohashi Director-General あて名: 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305-8566) 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN 平成 12 年 (2000) 7 月 31 日	



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
US Department of Commerce  
United States Patent and Trademark  
Office, PCT  
2011 South Clark Place Room  
CP2/5C24  
Arlington, VA 22202  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 23 May 2001 (23.05.01)	
International application No. PCT/JP00/06103	Applicant's or agent's file reference 127184-649
International filing date (day/month/year) 07 September 2000 (07.09.00)	Priority date (day/month/year) 07 September 1999 (07.09.99)
Applicant MIDOH, Naoki et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
30 March 2001 (30.03.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:  
\_\_\_\_\_

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Maria Kirchner
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38



P.B.5818 - Patentlaan 2  
2280 HV Rijswijk (ZH)  
☎ +31 70 340 2040  
TX 31651 epo nl  
FAX +31 70 340 3016

**Europäisches  
Patentamt**

Zweigstelle  
in Den Haag  
Recherchen-  
abteilung

**European  
Patent Office**

Branch at  
The Hague  
Search  
division

**Office européen  
des brevets**

Département à  
La Haye  
Division de la  
recherche

Hall, Marina  
Elkington and Fife  
Prospect House,  
8 Pembroke Road  
Sevenoaks,  
Kent TN13 1XR  
GRANDE BRETAGNE

**RECEIVED**

**16 MAY 2003**

**E. & F. SEVENOAKS**

Datum/Date

**16.05.03**

Zeichen/Ref./Réf. <b>MH/G18605EP</b>	Anmeldung Nr./Application No./Demande n°./Patent Nr./Patent No./Brevet n°. <b>00957009.4-2403-JP0006103</b>
Anmelder/Applicant/Demandeur/Patentinhaber/Proprietor/Titulaire <b>Meiji Seika Kaisha, Ltd.</b>	

## COMMUNICATION

The European Patent Office herewith transmits as an enclosure the European search report for the above-mentioned European patent application.

If applicable, copies of the documents cited in the European search report are attached.

☒ Additional set(s) of copies of the documents cited in the European search report is (are) enclosed as well.

## REFUND OF THE SEARCH FEE

If applicable under Article 10 Rules relating to fees, a separate communication from the Receiving Section on the refund of the search fee will be sent later.





European Patent  
Office

**SUPPLEMENTARY  
EUROPEAN SEARCH REPORT**

Application Number  
EP 00 95 7009

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.7)
X	BURMESTER J ET AL: "HIGHLY CONSERVED N-METHYLTRANSFERASES AS AN INTEGRAL PART OF PEPTIDE SYNTHASES" BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL, ACADEMIC PRESS, LONDON, GB, vol. 37, no. 2, October 1995 (1995-10), pages 201-207, XP000965322 ISSN: 1039-9712 see whole document and in particular "Summary" and Figs 1 and 2.	1-14	C12N9/00 C12N15/52 C12N1/15 C12P21/04 C12P21/00
X,D	MARAHIEL M A ET AL: "Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis" CHEMICAL REVIEWS, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, EASTON, US, vol. 97, no. 7, November 1997 (1997-11), pages 2651-2673, XP002133489 ISSN: 0009-2665 see "B. N-Methyltransferase Domain" * page 2654, right-hand column, line 8 - page 2656, right-hand column, paragraph 2; figure 3 *	1,2,4, 7-14	TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.7) C12P C12N
The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search.			
Place of search MUNICH		Date of completion of the search 9 May 2003	Examiner Ury, A
<b>CATEGORY OF CITED DOCUMENTS</b> X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document			

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 127184-649	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/06103	国際出願日 (日.月.年) 07.09.00	優先日 (日.月.年) 07.09.99
出願人(氏名又は名称) 明 治 製 菓 株 式 会 社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☐ 出願人が提出したものを承認する。

☒ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、  
第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

## 第Ⅲ欄 要約（第1ページの5の続き）

## 要 約 書

本発明によれば環状デプシペプチド、特にPF1022物質、を合成する酵素およびその遺伝子が提供される。本発明による環状デプシペプチド合成酵素は、（a）配列番号2のアミノ酸配列または（b）置換、欠失、付加、および挿入から選択される1以上の改変を有し、かつ環状デプシペプチド合成酵素活性を有する配列番号2のアミノ酸配列の改変アミノ酸配列を含んでなるものである。本発明による環状デプシペプチド合成酵素遺伝子は、上記環状デプシペプチド合成酵素をコードするヌクレオチド配列からなるものである。本発明によればまた、環状デプシペプチドの大量生産系、環状デプシペプチド合成酵素の製造法等が提供される。

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N9/00, 15/52, 1/15, C12P21/04

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N9/00-9/94, 15/52-15/61

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,  
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WECKWERTH, Wolfram et al., "Biosynthesis of PF1022A and Related Cyclooctadepsipeptides", The Journal of Biological Chemistry, June 9, 2000, Volume 275, Number 23, pages 17909-17915	1
A	EP, 780468, A1 (MEIJI SEIKA KAISHA LTD.) 25.6月.1997 (25.06.97) & WO, 97/00944, A1 & US, 5763221, A	1-14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリ

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.12.00

国際調査報告の発送日

19.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生

4N

8214

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	HAESE, Angela et al., "Molecular characterization of the enniatin synthetase gene encoding a multifunctional enzyme catalysing <i>N</i> -methyldepsipeptide formation in <i>Fusarium scirpi</i> ", Molecular Microbiology, March, 1993, Volume 7, Number 6, pages 905-914	1 - 1 4
A	SASAKI, Toru et al., "A new anthelmintic cyclodepsipeptide, PF1022A", The Journal of Antibiotics, May 25, 1992, Volume 45, Number 5, pages 692-697	1 - 1 4
A	EP, 382173, A2 (MEIJI SEIKA KAISHA LTD.) 16.8月.1990 (16.08.90) & AU, 9049215, A & NO, 9000528, A & CA, 2009508, A & JP, 3-35796, A & CN, 1046940, A & US, 5116815, A & DE, 69023934, E & ES, 2083392, T3 & KR, 132051, B1	1 - 1 4



(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 3 月 15 日 (15.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/18179 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 9/00, 15/52, 1/15, C12P 21/04

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/06103

(22) 国際出願日: 2000 年 9 月 7 日 (07.09.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願平11/253040 1999 年 9 月 7 日 (07.09.1999) JP  
特願2000/104291 2000 年 4 月 6 日 (06.04.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 明治製菓株式会社 (MEIJI SEIKA KAISHA, LTD.) [JP/JP]; 〒104-8002 東京都中央区京橋二丁目4番16号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 御堂直樹 (MIDOH, Naoki) [JP/JP]. 岡倉 薫 (OKAKURA, Kaoru) [JP/JP]. 宮本功一 (MIYAMOTO, Koichi) [JP/JP]. 渡辺 学 (WATANABE, Manabu) [JP/JP]. 矢内耕二 (YANAI, Koji) [JP/JP]. 安武哲也 (YASUTAKE, Tetsuya) [JP/JP]. 相原 智 (AIHARA, Sato) [JP/JP]. 二村孝文 (FUTAMURA, Takafumi) [JP/JP]. 村上 健 (MURAKAMI, Takeshi) [JP/JP]; 〒250-0852 神奈川県小田原市栢山 788 明治製菓株式会社 薬品技術研究所内 Kanagawa (JP). クラインカウフホルスト (KLEINKAUF, Horst) [DE/DE]; D-10587 ベルリン フランクリン・シュト

ラーセ 29, マックス・フォルマー・インスティテュート・フュア・ビオフィジカリッシェ・ケミー・ウント・ビオケミー, テヒニッシェ・ユニバルジテート・ベルリン Berlin (DE).

(74) 代理人: 佐藤一雄, 外 (SATO, Kazuo et al.); 〒100-0005 東京都千代田区丸の内三丁目2番3号 富士ビル 323号 協和特許法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CYCLIC DEPSIPEPTIDE SYNTHASES, GENES THEREOF AND MASS PRODUCTION SYSTEM OF CYCLIC DEPSIPEPTIDE

(54) 発明の名称: 環状デプシペプチド合成酵素およびその遺伝子並びに環状デプシペプチドの大量生産系

(57) Abstract: Enzymes synthesizing cyclic depsipeptides (in particular a substance PF1022) and genes thereof. These cyclic depsipeptide synthases contain: (a) the amino acid sequence of SEQ ID NO:2; or (b) an amino acid sequence derived from the above-described amino acid sequence by one or more modifications selected from among substitution, deletion, addition and insertion and having a cyclic depsipeptide synthase activity. The cyclic depsipeptide synthase genes comprise nucleotide sequences encoding the above-described cyclic depsipeptide synthases. Moreover, a mass production system of a cyclic depsipeptide, a process for producing a cyclic depsipeptide synthase, etc. are provided.

[続葉有]

WO 01/18179 A1



---

(57) 要約:

本発明によれば環状デブシペプチド、特に P F 1 0 2 2 物質、を合成する酵素およびその遺伝子が提供される。本発明による環状デブシペプチド合成酵素は、(a) 配列番号 2 のアミノ酸配列または (b) 置換、欠失、付加、および挿入から選択される 1 以上の改変を有し、かつ環状デブシペプチド合成酵素活性を有する配列番号 2 のアミノ酸配列の改変アミノ酸配列を含んでなるものである。本発明による環状デブシペプチド合成酵素遺伝子は、上記環状デブシペプチド合成酵素をコードするヌクレオチド配列からなるものである。本発明によればまた、環状デブシペプチドの大量生産系、環状デブシペプチド合成酵素の製造法等が提供される。

## 明 細 書

環状デブシペプチド合成酵素およびその遺伝子  
並びに環状デブシペプチドの大量生産系

## 発明の背景

発明の分野

本発明は、環状デブシペプチド合成酵素およびその遺伝子並びに環状デブシペプチドの大量生産系に関し、更に詳細には、駆虫活性を有する P F 1 0 2 2 物質の合成酵素およびその遺伝子並びに P F 1 0 2 2 物質の大量生産系に関する。

関連技術の説明

P F 1 0 2 2 物質 [シクロ (D-ラクチル-L-N-メチルロイシル-D-3-フェニルラクチル-L-N-メチルロイシル-D-ラクチル-L-N-メチルロイシル-D-3-フェニルラクチル-L-N-メチルロイシル) ] は、アゴノマイセタレス (Agonomycetales) に属する糸状菌、P F 1 0 2 2 菌株 (Mycelia sterilia, FERM BP-2671) により生産される環状デブシペプチドであり、動物寄生性の線虫類に対して極めて高い駆虫活性を示す (特開平3-35796号、Sasaki, T. et al. J. Antibiotics., 45, 692, (1992))。そのため、本物質は動物用の駆虫薬として有用であると共に、さらに高活性な本物質の誘導体を合成するための原料として有用である。

一般に、天然から分離された微生物の生産する二次代謝産物の量は、微量である。そのため、これを産業的に利用するためには、二次代謝産物の生産量を向上させる必要がある。生産量を向上させるためには、培養方法の検討、培地成分の検討、および前駆体の添加といった発酵条件の改良、並びに紫外線照射または突然変異誘発剤による突然変異を利用した菌株の改良が行われる。最近では、これらの方法に加えて遺伝子組換えの手法を利用した生産性の向上も行われるようになってきた。

その方法としては、生合成経路の酵素遺伝子の発現増強、生合成の制御遺伝子の発現増強、不必要な生合成経路の遮断、等が行われている (Khetan, A. and Hu, W.-S. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology 2nd editio

n, p. 717, (1999) )。また、特殊な例としては、酸素利用能の向上を目的として、細菌のヘモグロビン遺伝子を発現させ、生産性を向上させる方法も知られている (Minas, W. et al. Biotechnol. Prog., 14, 561, (1998))。

遺伝子組換えの手法を用いて生産性の向上を図る際に、最も一般的な手法は、生合成経路の酵素遺伝子の発現増強である。この手法を適応するためには、対象とする微生物において形質転換の方法が確立していること、発現増強のために利用可能なプロモーターおよびターミネーターが存在すること、また生合成経路が明らかとなっており、それらの遺伝子が単離されていることが必要である。PF 1022物質生産菌においては、形質転換により外来遺伝子を導入することに成功している (W097/00944号) が、生合成経路の遺伝子は単離されていない。

PF 1022物質は、L-N-メチルロイシン、D-乳酸、およびD-フェニル乳酸がエステル結合およびアミド結合を介して結合した構造からなり、生産菌中では4分子のL-ロイシン、2分子のD-乳酸、2分子のD-フェニル乳酸から、ある種のペプチド合成酵素により合成されと考えられる。ペプチド合成酵素とは、アミノ酸やヒドロキシ酸を基質として、ペプチド、デプシペプチド、リボペプチド、ペプチドラクトン等の微生物の二次代謝産物の生合成を行う酵素であり、既に幾つかのペプチド合成酵素の配列が明らかとなっている (Marahiel, M.A. et al. Chem. Rev., 97, 2651, (1997))。この酵素による反応は、mRNAを鋳型としたリボソームによるタンパク質の合成系とは全く異なっている。ペプチド合成酵素は、各基質に対して1つのドメインを持ち、各基質はこのドメインでATPにより活性化され、ドメイン中のホスホパントテン酸を介して結合し、これらが各ドメイン間の領域の触媒作用によりアミド結合やエステル結合を形成すると考えられている。

#### 発明の概要

本発明は環状デプシペプチド、特にPF 1022物質、を合成する酵素（以下「環状デプシペプチド合成酵素」とする）を提供することをその目的とする。

本発明はまた、環状デプシペプチド合成酵素をコードする遺伝子（以下「環状デプシペプチド合成酵素遺伝子」とする）を提供することをその目的とする。

本発明は更にまた、環状デプシペプチド合成酵素を発現させるための組換えベクターおよび形質転換体、並びに環状デプシペプチドの大量生産系およびその製

造法の提供をその目的とする。

本発明は、環状デプシペプチド合成酵素の製造法の提供をその目的とする。

本発明による環状デプシペプチド合成酵素は、下記からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなるタンパク質である：

- (a) 配列番号 2 のアミノ酸配列、および
- (b) 置換、欠失、付加、および挿入から選択される 1 以上の改変を有し、かつ環状デプシペプチド合成酵素活性を有する配列番号 2 のアミノ酸配列の改変アミノ酸配列。

本発明による環状デプシペプチド合成酵素遺伝子は、環状デプシペプチド合成酵素をコードするヌクレオチド配列からなるものである。

本発明による環状デプシペプチド合成酵素遺伝子はまた、下記からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなる：

- (c) 配列番号 1 の DNA 配列、
- (d) 配列番号 1 の DNA 配列と少なくとも 70 % の同一性を有し、かつ環状デプシペプチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列、
- (e) 置換、欠失、付加、および挿入から選択される 1 以上の改変を有し、かつ環状デプシペプチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードする配列番号 1 の DNA 配列の改変 DNA 配列、および
- (f) ストリンジェントな条件下で配列番号 1 の DNA 配列とハイブリダイズし、かつ環状デプシペプチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列。

本発明による組換えベクターは、本発明による環状デプシペプチド合成酵素遺伝子を含んでなるものである。

本発明による形質転換体および環状デプシペプチドの大量生産系は、本発明による組換えベクターを含んでなる宿主である。

本発明による環状デプシペプチドの製造法は、本発明による形質転換体を培養し、培養物から環状デプシペプチドを採取することを含んでなるものである。

本発明による環状デプシペプチド合成酵素の製造法は、本発明による形質転換体を培養し、培養物から環状デプシペプチド合成酵素を採取することを含んでな



るものである。

本発明によれば、環状デブシペプチド合成酵素をPF1022物質生産菌において過剰発現させることができ、またPF1022物質を大量に生産させることができる。

#### 図面の簡単な説明

図1はプラスミドpABP/PFsynの作製方法を示す。

図2はAbp1遺伝子を含む6kbのHindIII断片の制限酵素地図を示す。

図3はpABPdの構成および制限酵素地図を示す。

図4は親株およびpABP/PFsynを導入した遺伝子導入株から抽出したタンパク質の電気泳動の結果を示す。

図5は親株およびpABP/PFsynNを導入した遺伝子導入株から抽出したタンパク質の電気泳動の結果を示す。

#### 発明の具体的説明

##### 微生物の寄託

実施例1 1. に記載されるPF1022菌株は、1989年1月24日付で通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託された。受託番号は、FERM BP-2671である。

実施例2 1. (1)に記載されるプラスミドpPFsynで形質転換された大腸菌(DH5 $\alpha$ )は、1999年9月1日付で通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託された。受託番号は、FERM BP-7253である。

実施例2 1. (1)に記載されるプラスミドpPFsynNで形質転換された大腸菌(DH5 $\alpha$ )は、1999年9月1日付で通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託された。受託番号は、FERM BP-7254である。

##### 遺伝子およびタンパク質

本発明によれば環状デブシペプチド合成酵素、好ましくはPF1022物質合成酵素、およびその遺伝子が提供される。

本発明による酵素は、4分子のL-ロイシン、2分子のD-乳酸、および2分

子のD-フェニル乳酸に作用して、PF1022物質を合成できる。D-乳酸、L-ロイシン、およびD-フェニル乳酸をあらかじめ修飾しておくことによりPF1022物質の誘導体を製造できる。

PF1022物質の誘導体としては、例えば、PF1022物質中の二つのフェニル基のパラ位がアミノ基により置換されたものが挙げられる。この場合、PF1022物質の誘導体の合成基質としては、例えば、D-フェニル乳酸の代わりにD-p-アミノフェニル乳酸を使用できる。

配列(b)において、改変の数は、例えば1～数個、より具体的には1～6個であることができる。

配列(e)において、改変の数は、例えば1～数十個であることができる。

配列(b)および配列(e)において変異が複数個存在する場合、導入された変異の種類は同一でも異なってもよい。

配列(d)において、配列番号1のDNA配列との同一性は、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%であることができる。

配列(f)において、「ストリンジェントな条件」とは、ハイブリダイゼーション後のメンブレンの洗浄操作を、高温下低塩濃度溶液中で行うことを意味し、例えば、0.2×SSC濃度(1×SSC: 15 mMクエン酸3ナトリウム、150 mM塩化ナトリウム)、0.1% SDS溶液中で60°C、15分間の洗浄条件を意味する。

配列(b)に関して、「環状デプシペプチド合成酵素活性を有する」か否かは、例えば、環状デプシペプチドの基質を準備し、被験タンパク質を作用させ、環状デプシペプチドの生成を例えばクロマトグラフィーによって確認することにより評価することができる。

配列(d)、(e)、および(f)に関して、「環状デプシペプチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードする」か否かは、例えば、実施例2に記載のように被験ヌクレオチド配列を宿主にて発現させ、得られたタンパク質を環状デプシペプチドの基質と作用させ、環状デプシペプチドの生成を例えばクロマトグラフィーによって確認することにより評価することができる。

本発明による合成酵素のアミノ酸配列が与えられれば、それをコードするヌク



レオチド配列は容易に定まり、配列番号 2 に記載されるアミノ酸配列をコードする種々のヌクレオチド配列を選択することができる。従って、本発明による合成酵素をコードするヌクレオチド配列とは、配列番号 1 に記載の DNA 配列の一部または全部に加え、同一のアミノ酸をコードする DNA 配列であって縮重関係にあるコドンで DNA 配列として有する配列をも意味するものとし、更にこれらに対応する RNA 配列も含まれる。

本発明による遺伝子は例えば下記のようにして得ることができる。

P F 1 0 2 2 物質生産菌からゲノム DNA を抽出し、適当な制限酵素にて切断後、ファージベクターを用いて、P F 1 0 2 2 物質生産菌のゲノム DNA からなるライブラリーを作製する。ペプチド合成酵素のアミノ酸配列の保存領域、あるいは P F 1 0 2 2 物質生産菌から精製した環状ペプチド合成酵素の部分アミノ酸配列を元に、適当なプライマーを合成し、それを用いて P F 1 0 2 2 物質生産菌由来のゲノム DNA を鋳型とした P C R 法を実施し、環状ペプチド合成酵素遺伝子の DNA 断片を増幅する。この DNA 断片をプローブとして用い、ゲノムライブラリーのスクリーニングを行う。このようにして、環状ペプチド合成酵素遺伝子の全域を単離することができる。この DNA 断片の塩基配列を決定した後、翻訳開始コドンの上流および翻訳終始コドンの下流に、P C R 等の手法により適当な制限酵素切断部位を導入し、環状ペプチド合成酵素遺伝子のみを含む遺伝子断片を得ることができる。

#### 組換えベクター

本発明によれば環状デプシペプチド合成酵素をコードするヌクレオチド配列を含んでなる組換えベクターが提供される。

本発明による組換えベクターの構築の手順および方法は、遺伝子工学の分野で慣用されているものを用いることができる。

本発明において使用できるベクターとしては、宿主染色体 DNA に組込まれるものや、自己複製可能な自律的複製配列を有するベクターを宿主細胞内でプラスミド状態で存在させるものが挙げられ、例えば、pUC 系 (pUC18 または pUC118 等)、pBluescript 系 (pBluescriptII KS+ 等)、および pBR322 等のプラスミドが挙げられる。宿主細胞内に存在する遺伝子のコピー数は、1 コピーでも複数であっても良い。

本発明による組換えベクターは、例えば、環状デブシペプチド合成酵素をコードするヌクレオチド配列の上流にプロモーターを、また下流にターミネーターをそれぞれ作動可能に連結し、場合によっては遺伝子マーカールおよび／または他の制御配列を作動可能に連結することにより作製できる。

本発明による遺伝子へのプロモーターおよびターミネーターの連結、および発現ユニットのベクターへの挿入は、公知の方法に従って行うことができる。

本発明に用いるプロモーターおよびターミネーターは特に限定されず、例えば3-ホスホグリセレートキナーゼ、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、エノラーゼ等の解糖系酵素遺伝子の制御配列、オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ、トリプトファンシンターゼ等のアミノ酸合成系酵素遺伝子の制御配列、アミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、セルラーゼ、アセトアミダーゼ等の加水分解酵素遺伝子の制御配列、ナイトレイトレダクターゼ、オロチジン-5'-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ等の酸化還元酵素遺伝子の制御配列、およびAbp1等のPF1022物質生産菌中で高発現するPF1022物質生産菌由来の遺伝子の制御配列が挙げられる。

本発明による遺伝子を他のタンパク質の翻訳領域をコードする外来遺伝子と連結させて融合タンパク質として発現させてもよい。

遺伝子マーカの導入は、例えば、制御配列にPCR法により適当な制限酵素切断部位を導入し、これをプラスミドベクターに挿入した後、薬剤耐性遺伝子および／または栄養要求性相補遺伝子等の選択マーカール遺伝子を連結する事により行うことができる。

遺伝子マーカールは形質転換体の選択手法に応じて適宜選択できるが、例えば、薬剤耐性をコードする遺伝子や栄養要求性を相補する遺伝子を使用することができる。薬剤耐性遺伝子としては、デストマイシン、ベノミル、オリゴマイシン、ハイグロマイシン、G418、ブレオマイシン、ピアラホス、ブラストサイジンS、フレオマイシン、フォスフィノスリシン、アンピシリン、カナマイシン等の薬剤に対する遺伝子が挙げられる。栄養要求性を相補する遺伝子としては、amdS、pyrG、argB、trpC、niaD、TRP1、LEU2、URA3等の遺伝子が挙げられる。

### 形質転換体および環状デプシペプチドの製造

本発明によれば前記ベクターにより形質転換された宿主が提供される。

本発明において使用できる宿主としては、遺伝子組換えの宿主として使用可能な微生物であれば特に限定されるものではない。使用できる宿主の例としては、任意の細菌類または真菌類の微生物が挙げられ、好ましくは大腸菌、バチルス属細菌、放線菌、酵母、糸状菌、より好ましくは、P F 1 0 2 2 物質を生産する糸状菌、最も好ましくはP F 1 0 2 2 菌株 (*Mycelia sterilia*, FERM BP-2671) である。

宿主への遺伝子発現用の組換えベクターの導入は、常法に従って行うことができる。導入法としては、例えば、エレクトロポレーション法、ポリエチレングリコール法、アグロバクテリウム法、リチウム法または塩化カルシウム法等が挙げられ、宿主細胞にとって効率の良い手法が選択される。P F 1 0 2 2 物質生産菌を宿主として用いる場合、好ましくはポリエチレングリコール法である。

形質転換体の培養は常法に従って、培地、培養条件等を適宜選択することにより行うことができる。培地としては、慣用の成分、例えば炭素源としては、グルコース、シュークロース、セルロース、水飴、デキストリン、澱粉、グリセロール、糖蜜、動・植物油等が使用できる。また、窒素源としては、大豆粉、小麦胚芽、ファーマメディア、コーン・スティーブ・リカー、綿実粕、ブイヨン、ペプトン、ポリペプトン、マルトエキス、イーストエキス、硫酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、尿素等が使用できる。その他必要に応じ、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、コバルト、塩素、リン酸、硫酸およびその他のイオンを生成することのできる無機塩類、例えば塩化カリウム、炭酸カルシウム、リン酸水素2カリウム、硫酸マグネシウム、リン酸1カリウム、硫酸亜鉛、硫酸マンガン、硫酸銅を添加することも有効である。また、必要に応じてチアミン（チアミン塩酸塩等）等の各種ビタミン、グルタミン酸（グルタミン酸ナトリウム等）、アスパラギン（DL-アスパラギン等）等のアミノ酸、ヌクレオチド等の微量栄養素、抗生物質等の選抜薬剤を添加することもできる。さらに、菌の発育を助け、環状デプシペプチドの生産を促進するような有機物および無機物を適当に添加することができる。

培養法としては、好氣的条件での振とう培養法、通気攪拌培養法または深部好気培養法により行うことができるが、特に深部好気培養法が最も適している。培地のpHは、例えばpH6～pH8程度である。培養に適当な温度は、15℃～40℃であるが、多くの場合26℃～37℃付近で生育する。環状デプシペプチド合成酵素および環状デプシペプチドの生産は、培地および培養条件、または使用した宿主により異なるが、いずれの培養法においても通常2日～25日間でその蓄積が最高に達する。

培養中の環状デプシペプチド合成酵素、あるいは環状デプシペプチドの量が最高になった時に培養を停止し、培養物から環状デプシペプチド合成酵素あるいは環状デプシペプチドを単離、精製する。

培養物から環状デプシペプチド合成酵素あるいは環状デプシペプチドを採取するためには、その性状を利用した通常分離手段、例えば溶剤抽出法、イオン交換樹脂法、吸着または分配カラムクロマトグラフィー法、ゲル濾過法、透析法、沈殿法、結晶化法等を単独で、または適宜組み合わせて抽出精製することができる。

環状デプシペプチド合成酵素は、例えば、ブチルアガロース等を使用した疎水性クロマトグラフィーにより効率よく精製できる。

環状デプシペプチドは、例えば、培養物中からはアセトン、メタノール、ブタノール、酢酸エチル、酢酸ブチル等で抽出できる。環状デプシペプチドをさらに精製するには、シリカゲル、アルミナ等の吸着剤、セファデックス LH-20（ファルマシア社）またはトヨパールHW-40（東ソー社）等を用いるクロマトグラフィーを行うと良い。以上のような方法により、またはこれらを適宜組み合わせることにより、純粋な環状デプシペプチドが得られる。

本発明によれば、環状デプシペプチドの大量生産系が提供される。環状デプシペプチドの生産系、特にPF1022物質の生産系として使用できる宿主としては、PF1022物質を生産する糸状菌が好ましく、最も好ましくはPF1022菌株 (Mycelia sterilia, FERM BP-2671) である。形質転換に用いられる組換えベクターとしては、PF1022物質生産菌で機能する制御配列（プロモーター、ターミネーター等）を環状デプシペプチド合成酵素遺伝子に作動可能に連結した発現ベクターが好ましく、最も好ましくはPF1022菌株 (Mycelia ster



ilia、FERM BP-2671) において機能する制御配列を環状デプシペプチド合成酵素遺伝子に作動可能に連結した発現ベクターである。環状デプシペプチド、特に P F 1 0 2 2 物質は、好ましくは、P F 1 0 2 2 物質生産菌で機能する制御配列が環状デプシペプチド合成酵素遺伝子に作動可能に連結された発現ベクターによって形質転換された P F 1 0 2 2 物質生産菌を培養し、培養物から環状デプシペプチドを単離することにより製造できる。

P F 1 0 2 2 物質の基質である L-ロイシン、D-乳酸、または D-フェニル乳酸を合成しない宿主においては、不足する基質または基質の誘導体を添加して培養することにより、P F 1 0 2 2 物質または P F 1 0 2 2 物質の誘導体を生産させることが可能である。

### 実 施 例

以下に実施例により本発明を詳述するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 実施例 1 : P F 1 0 2 2 物質生産菌からの環状デプシペプチド合成酵素遺伝子のクローニング

##### 1. ゲノムDNAの単離とゲノムライブラリーの作製

ゲノムDNAは、P F 1 0 2 2 菌株 (Mycelia sterilia、FERM BP-2671) に対して UV照射または NTG 処理により突然変異を誘発し、P F 1 0 2 2 の生産性を向上させた P F 1 0 2 2 物質生産菌 432-26 株から抽出した。P F 1 0 2 2 物質生産菌 432-26 株を 50 ml の種培地 [1% イーストエキス、1% マルトエキス、2% ポリペプトン、2.5% グルコース、0.1% リン酸水素 2 カリウム、0.05% 硫酸マグネシウム (pH 7.0) ] で 26°C にて 2 日間培養し、遠心分離により菌体を回収した。得られた菌体を液体窒素で凍結後、乳鉢と乳棒を用いて磨砕した。この磨砕した菌体から ISOP LANT (ニッポンジーン社) により、添付のプロトコールに従いゲノムDNAを単離した。単離したゲノムDNAを Sau3A I により部分分解した後、アガロースゲル電気泳動により 15-kb ~ 20-kb の DNA 断片を回収し、これをアルカリフォスファターゼで処理し、DNA断片の末端を脱リン酸化した。このDNA断片をファージベクターの Lambda DASH II (ストラタジーン社) に挿入した。このようにして得られた組換えファージベクターについて、Gigapack III Gold Packaging Extract (ストラタジー

ン社)により、添付のプロトコールに従ってin vitroパッケージングを行った。その後、この組換えファージを大腸菌XL1-Blue MRA (P2)株に感染させ、プレートにて培養しブランクを形成させた。

## 2. 環状デブシペプチド合成酵素遺伝子の部分DNA断片の単離

既知のペプチド合成酵素のマルチプルアライメントを行い、良好に保存された領域として、WTSMYDG (配列番号3) とVVQYFPT (配列番号4) を見出した。これらの配列を元に、5' - TGGACIWSNATGTAYGAYGG -3' (配列番号5) および5' - GTIG GRAARTAYTGIACNAC -3' (配列番号6) のプライマーを合成した。これらのプライマーを用い、P F 1 0 2 2 物質生産菌から単離したゲノムDNAを鋳型としてPCRを行った。PCRは、50  $\mu$ lの反応液中、ゲノムDNA50 ngを鋳型とし、1.25 unitのExTaq DNAポリメラーゼ (宝酒造社)、添付のバッファーおよびdNTP Mixture、および10  $\mu$ Mのプライマーを用い、以下の条件で反応を行った。94°C 3分間、[94°C 1分間、65°C (1サイクル毎に0.5°C下げる) 1分間、72°C 1分間]  $\times$  30回、72°C 3分間。この反応により約350 bpのDNA断片が増幅し、このDNA断片をOriginal TA Cloning Kit (インビトロジェン社) を用い、添付のプロトコールに従ってpCR2.1プラスミドベクターに挿入した。

このようにしてクローニングしたDNA断片の塩基配列の決定は、DNA Sequencing Kit dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (アプライドバイオシステムズ社) とABI PRISM 310 Genetic Analyzer (アプライドバイオシステムズ社) を用いて、添付のプロトコールに従い行った。その結果、単離したDNA断片の塩基配列は、ペプチド合成酵素遺伝子と相同性を示し、目的とする環状デブシペプチド合成酵素遺伝子の一部であることが明らかとなった。

## 3. 環状デブシペプチド合成酵素遺伝子全域のクローニング

ゲノムライブラリーのスクリーニングに使用したプローブは、PCRにより、フルオレセイン標識dUTPをDNA断片に取り込ませることにより調製した。PCRは、50  $\mu$ lの反応液中、100 ngの環状デブシペプチド合成酵素遺伝子DNA断片が挿入されたpCR2.1プラスミドベクターを鋳型とし、1.25 unitのExTaq DNAポリメラーゼ (宝酒造社) および添付のバッファー、0.2 mM dATP、0.2 mM dCTP、0.2 mM dGTP、0.02 mM dTTP、0.18 mM フルオレセイン標識dUTP (FluoroGreen、アマシャム フ

アルマシア バイオテック社) および10 $\mu$ Mのプライマー (配列番号 5 および配列番号 6) を用い、以下の条件で反応を行った。94°C 2分間、(94°C 30秒間、55°C 1分間、72°C 1分間)  $\times$ 25回、72°C 3分間。この反応により、約350 bpのフルオレセイン標識プローブが作製された。

実施例 1 の 1 において作製したブランクの形成されたプレート上に、Hybond-N +メンブレン (アマシャム ファルマシア バイオテック社) を載せ、ブランクを付着させた。このメンブレンをアルカリ処理し、メンブレン上の組換えファージDNAを1本鎖に変性しメンブレンに吸着させた。ファージDNAが吸着したメンブレンを、Hybridization Buffer Tablets (アマシャム ファルマシア バイオテック社) を用いて調製したバッファーに入れた後、60°Cで1時間インキュベートした。これに、上記のフルオレセインでラベルされたプローブを熱変性して添加し、60°Cで一晩ハイブリダイゼーションを行った。その後、メンブレンを1 $\times$ SSC (SSC: 15 mMクエン酸3ナトリウム、150 mM塩化ナトリウム) -0.1% SDS溶液中で60°C、15分間洗浄し、さらに、0.2 $\times$ SSC-0.1% SDS溶液中で60°C、15分間洗浄した。フルオレセインが結合したブランクの可視化は、DIG洗浄ブロックバッファーセット (ベーリンガー・マンハイム社)、アルカリフォスファターゼでラベルされた抗フルオレセイン抗体 (Anti-fluorescein-AP, Fab fragment、ベーリンガー・マンハイム社)、発色基質としてニトロブルーテトラゾリウムクロライド (ベーリンガー・マンハイム社) およびX-フォスフェート (ベーリンガー・マンハイム社) を用い、添付のプロトコールに従って行った。このようにしてプローブに相同な領域の5'上流域および3'下流域を含む陽性クローンを選抜した。

#### 4. 塩基配列の決定

このようにして単離された陽性クローン中のDNA断片を、ファージベクターの配列である5' - GCGGAATTAACCCTCACTAAAGGGAACGAA -3' (配列番号 7) および5' - GCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAAGAA -3' (配列番号 8) をプライマーとして用い、PCRにより増幅した。PCRは、50 $\mu$ lの反応液中、陽性クローンDNA100 ngを鋳型とし、2.5 unitのLA Taq DNAポリメラーゼ (宝酒造社)、添付のバッファーおよびdNTP Mixture、2.5 mM塩化マグネシウム、および0.2 $\mu$ Mのプライマーを用い、以下の条件で反応を行った。94°C 1分間、(98°C 10秒間、68°C 15分間)  $\times$ 25回、



72°C 15分間。得られたPCR産物を精製した後、ネブライザー処理し、ランダムに0.5 kb~2.0 kbに分解した。この断片の末端をT4 DNAポリメラーゼで平滑化し、T4ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した後、pT7Blue（ノバジェン社）のEcoRV部位に挿入し、大腸菌JM109株に導入した。このようにして得られた168個のコロニーをM13 Primer M4（宝酒造社）およびM13 Primer RV（宝酒造社）を用いて直接PCRし、これを精製した後、M13 Primer M4（宝酒造社）をプライマーとしてシーケンスを行った。PCRは、50 $\mu$ lの反応液中、1.25 unitのExTaq DNAポリメラーゼ（宝酒造社）、添付のバッファーおよびdNTP Mixture、および0.5 $\mu$ Mのプライマーを用い、以下の条件で反応を行った。94°C 4分間、（94°C 30秒間、55°C 30秒間、72°C 2分間） $\times$ 30回、72°C 3分間。また、シーケンスは、DNA Sequencing Kit dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction（アプライドバイオシステムズ社）とABI PRISM 310 Genetic Analyzer（アプライドバイオシステムズ社）を用いて、添付のプロトコールに従い行った。

得られた結果から、解析が不十分な領域については、プライマーを解析済みの塩基配列を元に新たに設計してPCRにより増幅し、これを精製した後、PCRに用いたプライマーを用いてシーケンスを行った。これにより、陽性クローン中のDNA断片15606 bpの塩基配列を決定した。

この配列を解析したところ9633 bpからなるオープンリーディングフレーム（ORF）が存在し、この配列から予測されるタンパク質は、3210アミノ酸残基、354 kDaであり、ペプチド合成酵素と相同性を示すことが明らかとなった。また、最も高い相同性を示したタンパク質はエニアチン合成酵素（S39842）であり、その相同性は56%であった。このように単離した本発明の環状デブシペプチド合成酵素遺伝子のORFの塩基配列を配列表の配列番号1に、またそのアミノ酸配列を配列番号2に示した。

## 実施例2：環状デブシペプチド合成酵素遺伝子の過剰発現によるPF1022生産性の向上

### 1. 遺伝子発現用の組換えベクターの構築（図1）

#### （1）環状デブシペプチド合成酵素遺伝子領域のクローニング

実施例1の3で得られた陽性クローンから、挿入されたDNA断片をNotIにより切

り出し、pBluescriptII KS+ (ストラタジーン社) のNotI部位に挿入し、プラスミドpPF7を作製した。pPF7をBanIIIおよびSmaIにより切断した後、アガロースゲル電気泳動し、約8250 bpのDNA断片をアガロースゲルから回収した。この断片をpBluescriptII KS+に挿入し、プラスミドpPF7-1を作製した。

pPF7を鋳型とし、N末端付近からBanIII部位までの約440 bp (配列番号9および配列番号10を使用) または約470 bp (配列番号11および配列番号10を使用) を増幅するためのプライマーとして、5' - AGCATCGGATCCTAACAATGGGCGTTGAGCAGCAAGCCTA -3' (配列番号9、ORFのN末端から10番目のMetから翻訳開始するように設計) または5' - AGCATCGGATCCTAACAATGTCAAACATGGCACCCTCCCTA -3' (配列番号11、ORFのN末端1番目のMetから翻訳開始するように設計)、および5' - TTTGCTTCGTACTCGGGTCCT -3' (配列番号10) を用い、また、SmaI部位からC末端までの約920 bpを増幅するためのプライマーとして、5' - GCATCGCGATACTAGAGAAG -3'

(配列番号12) および5' - AGCATCGAATTCGGATCCCTAAACCAACGCCAAAGCCCGAAT -3' (配列番号13) を用いてPCRを行った。この際、本発明の環状デプシペプチド合成酵素遺伝子の5' 側および3' 側に、BamHI部位を導入するようにプライマーの設計を行った。PCRは、50  $\mu$ lの反応液中、150 ngのプラスミドDNAを鋳型とし、2.5 unitのKOD DNAポリメラーゼ (東洋紡績社)、添付のバッファーおよびdNTP Mixture、1 mM塩化マグネシウム、および0.5  $\mu$ Mのプライマーを用い、以下の条件で反応を行った。98°C 30秒間、(98°C 15秒間、65°C 2秒間、74°C 30秒間)  $\times$ 10回、74°C 1分間。各プライマーを用いて得られたPCR反応液をエタノール沈殿し、PCR産物を回収した。N末端領域に関しては、BamHIおよびBanIIIにより、また、C末端領域に関しては、SmaIおよびBamHIにより切断した後、アガロースゲル電気泳動し、DNA断片をアガロースゲルから回収した。

pPF7-1のSmaI、BamHI部位に、上記のC末端領域PCR断片を挿入し、プラスミドpPF7-2を作製した。このプラスミドをBanIIIおよびBamHIで切断した後、アガロースゲル電気泳動し、約9170 bpのDNA断片をアガロースゲルから回収した。このDNA断片並びに配列番号9および配列番号10を用いて作製したN末端領域を、同時に、pBluescript II KS+のBamHI部位に挿入することにより、本発明の環状デプシペプチド合成酵素遺伝子を再構築し、プラスミドpPFsyn(ORFのN末端から10番目の

Metから翻訳開始)を作製した。

一方、pPF7-2から切り出した約9170 bpのDNA断片並びに配列番号9および配列番号11を用いて作製したN末端領域を、同時に、pHSG299（宝酒造社）のBamHI部位に挿入することにより、本発明の環状デブシペプチド合成酵素遺伝子を再構築し、プラスミドpPFsynN(ORFのN末端1番目のMetから翻訳開始)を作製した。このようにして両末端にBamHI部位を持つ環状デブシペプチド合成酵素遺伝子を作製した。

pPFsynまたはpPFsynNをBamHIで切断した後、環状デブシペプチド合成酵素遺伝子領域をそれぞれゲルから回収した。

## (2) Abp1遺伝子の発現制御領域を用いた発現ベクターの構築

### P F 1 0 2 2 物質生産菌のゲノムDNAの単離

P F 1 0 2 2 物質生産菌 (FERM BP-2671) のゲノムDNAの単離は (H. Horiuchi et. al., J. Bacteriol., 170, 272-278, (1988)) に記載の方法に従った。具体的には、まずP F 1 0 2 2 菌株 (FERM BP-2671) を種培地 (可溶性澱粉 2.0 %、グルコース 1.0 %、ポリペプトン 0.5 %、小麦胚芽 0.6 %、酵母エキス 0.3 %、大豆粕 0.2 %および炭酸カルシウム 0.2 % ; 殺菌前がpH 7.0 ; W097/00944号 実施例1参照) で2日間培養し、遠心分離 (3500rpm、10分) によって菌体を回収した。次いで、得られた菌体を凍結乾燥後、TEに懸濁し、3%SDS溶液中、60°C、30分間処理後、TE飽和フェノール抽出により、菌体残渣を除去した。抽出液はエタノール沈殿化後、リボヌクレアーゼA (シグマ社製) およびプロテイナーゼK (和光純薬社製) 処理し、さらに12%ポリエチレングリコール6000により核酸を沈殿化させた。これをTE飽和フェノール抽出、エタノール沈殿化を行い、同沈殿をTEに溶解し、これをゲノムDNAとした。

### P F 1 0 2 2 物質生産菌のゲノムライブラリーの作製

上記のように調製した PF1022 物質生産菌由来ゲノム DNA を Sau3AI により部分消化した。これをファージベクター、λ EMBL3 クローニングキット (ストラタジーン社製) の BamHI アームに T4 リガーゼ (宝酒造社製ライゲーションキット Ver.2) を用いて連結させた。これをエタノール沈殿後、TE に溶解した。連結混合物の全量をギガパック III プラスパッケージングキット (ストラタジーン社製) を用いて、大腸菌 LE392 株に感染させ、ファージプラークを形成させた。こ

の方法により得られた  $1.3 \times 10^4$  個 ( $2.6 \times 10^4$  PFU/ml) のファージライブラリーを用いて Abp1 遺伝子のクローニングを行った。

#### P F 1 0 2 2 物質生産菌由来のゲノムDNAからのAbp1遺伝子クローニング

プローブはAbp1遺伝子の翻訳領域をPCR法により増幅し、用いた。前記のように P F 1 0 2 2 物質生産菌から調製したゲノムDNAを鋳型に、8-73Uおよび8-73Rなる合成プライマーを用いて、レッツゴーPCRキット（サフディーテクノロジー社製）に従いPCRを行った。PCRの反応条件は、94°C30秒間、50°C30秒間、72°C90秒間のステップを25回繰り返すことにより増幅を行った。以下に8-73Uおよび8-73RのDNA配列を示す。

8-73U: CTCAAACCAGGAACTCTTTC (配列番号 1 4)

8-73R: GACATGTGGAAACCACATTTTG (配列番号 1 5)

このようにして得られたPCR産物はECLダイレクトシステム（アマシャムファルマシアバイオテク社製）を用いて、標識化した。前記のように作成したファージブランクを、ハイボンドN+ナイロントランスファーマンブラン（アマシャムファルマシアバイオテク社製）に転写し、アルカリ変成後、5倍濃度SSC（SSC: 15mM クエン酸3ナトリウム、150mM 塩化ナトリウム）で洗浄し、乾燥させDNAを固定した。キットに記載の方法に従って、1時間のプレハイブリダイゼーション（42°C）の後、先の標識化したプローブを添加し、16時間（42°C）ハイブリダイゼーションを行った。プローブの洗浄は前述キットに記載の方法に従った。プローブの洗浄を行ったナイロン膜は、検出溶液に1分間浸したあと、メディカルX線フィルム（富士写真フィルム社製）に感光させ、1個の陽性クローンを得た。本クローンはサザン解析の結果、少なくとも6kbのHindIII断片がゲノムDNAの制限酵素断片長と一致していた。このHindIII断片の制限酵素地図を図2に示す。HindIII断片はpUC119にサブクローニングし（pRQHin/119）、以降の実験に供した。

#### 発現ベクターの構築

pRQHin/119を鋳型にAbp1遺伝子のプロモーター領域およびターミネーター領域をPCR法を用いて増幅した。プロモーターの増幅はABP-NecoおよびABP-Nbam、一方、ターミネーターの増幅はABP-CbamおよびABP-Cxbaなるプライマーを用い、PCRスーパーミックスハイフィデリティ（ライフテックオリエンタル社製）によりPCR法を



行った。反応条件は、94°C30秒間、50°C30秒間、72°C90秒間のステップを25回繰り返すことにより増幅を行った。以下にABP-Nco、ABP-Nba、ABP-CbaおよびABP-CxaのDNA配列を示す。

ABP-Nco: GGGGAATTCGTGGGTGGTGATATCATGGC (配列番号 16)

ABP-Nba: GGGGGATCCTTGATGGGTTTTGGG (配列番号 17)

ABP-Cba: GGGGGATCCTAACTCCCATCTATAGC (配列番号 18)

ABP-Cxa: GGGTCTAGACGACTCATTGCAGTGAGTGG (配列番号 19)

各PCR産物はマイクロスピンS-400カラム（アマシャムファルマシアバイオテク社製）で精製し、エタノール沈殿化の後、プロモーターはEcoRIおよびBamHI、ターミネーターはBamHIおよびXbaIで消化し、同様の酵素で消化したpBluescriptII KS+に順次連結した。これをXbaIで消化し、pMKD01 (W098/03667号) 由来デストマイシン耐性カセットを挿入しpABPdを構築した（図3）。pABPdはAbp1遺伝子のプロモーターおよびターミネーターを有する。

前記のようにゲルから回収した環状デブシペプチド合成酵素遺伝子領域をpABPdのBamHI部位に挿入し、環状デブシペプチド合成酵素遺伝子を発現させるための発現ベクターであるpABP/PFsyn(ORFのN末端から10番目のMetから翻訳開始)およびpABP/PFsynN(ORFのN末端1番目のMetから翻訳開始)を作製した。

## 2. PF1022物質生産菌への環状デブシペプチド合成酵素遺伝子の導入と発現

PF1022菌株 (*Mycelia sterilia*, FERM BP-2671) への発現ベクターの導入は、W097/00944号に記載された実施例1の方法に従って行い、ハイグロマイシンBに対する耐性度の高い株を選抜した。これらの株における目的遺伝子の導入の確認は、Abp1プロモーターの配列から作製したプライマー、5' - TGATATGCTGGAGCTTCCCT -3' (配列番号20) および環状デブシペプチド合成酵素遺伝子の配列から作製したプライマー、5' - GCACAACCTCTTCCAGGCT -3' (配列番号21) を用いたPCRにより行った。このようにしてハイグロマイシンBに対する耐性度が高く本発明の環状デブシペプチド合成酵素遺伝子が導入された遺伝子導入株を選抜した。

50 mlの種培地にて遺伝子導入株および親株 (*Mycelia sterilia*, FERM BP-

2671) をそれぞれ別々に26°Cで2日間培養した後、それぞれの培養液1 mlを50 mlの別々の生産培地 [6%水飴、2.6%澱粉、2%小麦胚芽、1%ファーマメディア、0.2%硫酸マグネシウム7水和物、0.2%炭酸カルシウム、0.3%塩化ナトリウム (pH 7.5) ] に接種し、26°Cで4日間培養した。培養液を4500rpmで5分間遠心することにより集菌し、得られたそれぞれの菌体を0.3 M塩化カリウムで洗浄した。それぞれの菌体を液体窒素により凍結した後、凍結乾燥を行った。

以下に示す抽出操作は、氷上、または4°Cの低温室にて実施した。凍結乾燥した菌体10 mgおよび1.0 mlのガラスビーズ (径0.5 mm) を入れた2 mlのマイクロチューブに、1.0 mlの抽出バッファー [50 mMトリス-塩酸 (pH8.0)、0.3 M塩化カリウム、60%グリセロール、10 mMエチレンジアミン4酢酸2ナトリウム、5 mMジチオスレイトール、10  $\mu$ Mロイペプチン、1 mMフェニルメタンスルホン酸、60  $\mu$ g/mlキモスタチン] を添加した。このマイクロチューブをMini-Bead-Beater-8 (バイオスベック社) にセットし、最高速度で3分間運転することにより抽出を行った。これを15000 rpmで5分間遠心した後、100  $\mu$ lの上清を100  $\mu$ lの10%トリクロロ酢酸溶液中加入し、混合した。15分間放置した後、15000 rpmで10分間遠心し、得られた沈殿を、15  $\mu$ lのアルカリ溶液 (2%炭酸ナトリウム、0.4%水酸化ナトリウム) に溶解し、60  $\mu$ lのサンプルバッファー [125 mMトリス-塩酸 (pH6.8)、20%グリセロール、4%ドデシル硫酸ナトリウム、10% 2-メルカプトエタノール、50 mg/l ブロムフェノールブルー] を添加した。これを沸騰水中で5分間加熱した後、電気泳動システム (テフコ社) により、4%~20%のポリアクリルアミドゲルを使用して電気泳動 [Sodium Dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ] を行った。電気泳動後のポリアクリルアミドゲルは、クイック-CBB (和光純薬社) を用い、添付のプロトコールに従い染色した。親株およびpABP/PFsynを導入した遺伝子導入株から抽出したタンパク質の電気泳動の結果を図4に示した。また、親株およびpABP/PFsynNを導入した遺伝子導入株から抽出したタンパク質の電気泳動の結果を図5に示した。

このように、遺伝子導入株の環状デブシペプチド合成酵素の発現量は、親株に比べ顕著に高かった。

### 3. P F 1 0 2 2 物質の抽出と定量

50 mlの種培地にて遺伝子導入株および親株をそれぞれ別々に26°Cで2日間培養した後、それぞれの培養液1 mlを50 mlの別々の生産培地に接種し、26°Cで6日間培養した。それぞれの培養液から10 ml分を採取し3000 rpmで10分間遠心し、別々に集菌した。それぞれの菌体に10 mlのメタノールを加えて激しく振とうし、30分間静置した。その後、再度振とうし、3000 rpmで10分間遠心した後、上清中のそれぞれの菌体から抽出したP F 1 0 2 2物質を液体クロマトグラフィーにより各々定量した。カラムとしては、LiChrospher 100 RP-18 (e) (関東化学社)を用い、カラム温度は40°C、移動相は80%アセトニトリル、流速は1.0 ml/minとして、210 nmの吸収によりP F 1 0 2 2物質を検出した。この条件におけるP F 1 0 2 2物質の保持時間は5分間～6分間であった。実験は2反復で行い、親株およびpABP/PFsynを導入した遺伝子導入株から抽出したP F 1 0 2 2物質の定量結果の平均値を表1に示した。

表 1

	P F 1 0 2 2 物質 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
親株	8 8
遺伝子導入株	2 2 2

遺伝子導入株は親株の約2.5倍のP F 1 0 2 2物質の生産性を示した。本発明の環状デプシペプチド合成酵素を過剰発現させることにより、P F 1 0 2 2物質の生産性が高まることが明らかとなった。

また、親株およびpABP/PFsynNを導入した遺伝子導入株から抽出したP F 1 0 2 2物質の定量結果の平均値を表2に示した。

表 2

	P F 1 0 2 2 物質 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
親株	2.9
遺伝子導入株 1	1 2 3
遺伝子導入株 2	1 3 6
遺伝子導入株 3	1 7 2



遺伝子導入株は親株の4.3～6.0倍のP F 1 0 2 2物質の生産性を示した。本発明の環状デプシペプチド合成酵素を過剰発現させることにより、P F 1 0 2 2物質の生産性が高まることが明らかとなった。

## 請求の範囲

1. 下記からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる、タンパク質：
  - (a) 配列番号 2 のアミノ酸配列、および
  - (b) 置換、欠失、付加、および挿入から選択される 1 以上の改変を有し、かつ環状デプシペプチド合成酵素活性を有する配列番号 2 のアミノ酸配列の改変アミノ酸配列。
2. 請求項 1 に記載のタンパク質をコードするポリヌクレオチド。
3. 配列番号 1 の DNA 配列からなる、請求項 2 に記載のポリヌクレオチド。
4. 下記からなる群から選択されるポリヌクレオチド：
  - (c) 配列番号 1 の DNA 配列、
  - (d) 配列番号 1 の DNA 配列と少なくとも 70 % の同一性を有し、かつ環状デプシペプチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列、
  - (e) 置換、欠失、付加、および挿入から選択される 1 以上の改変を有し、かつ環状デプシペプチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードする配列番号 1 の DNA 配列の改変 DNA 配列、および
  - (f) ストリンジェントな条件下で配列番号 1 の DNA 配列とハイブリダイズし、かつ環状デプシペプチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列。
5. (d) が配列番号 1 の DNA 配列と少なくとも 80 % の同一性を有するヌクレオチド配列である、請求項 4 に記載のポリヌクレオチド。
6. (d) が配列番号 1 の DNA 配列と少なくとも 90 % の同一性を有するヌクレオチド配列である、請求項 4 に記載のポリヌクレオチド。
7. 請求項 2 ～ 6 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含んでなる、組換えベクター。
8. 請求項 7 に記載の組換えベクターを含んでなる宿主。
9. 環状デプシペプチド合成酵素を発現している、請求項 8 に記載の宿主。
10. PF 1022 物質生産菌である、請求項 8 または 9 に記載の宿主。

11. 請求項8～10のいずれか一項に記載の宿主を培養し、培養物から環状デブシペプチドを採取することを含んでなる、環状デブシペプチドの製造法。

12. 環状デブシペプチドがPF1022物質およびその誘導体である、請求項11に記載の製造法。

13. 請求項8～10のいずれか一項に記載の宿主を培養し、培養物から環状デブシペプチド合成酵素を採取することを含んでなる、環状デブシペプチド合成酵素の製造法。

14. 環状デブシペプチドがPF1022物質およびその誘導体である、請求項13に記載の製造法。

1 / 4

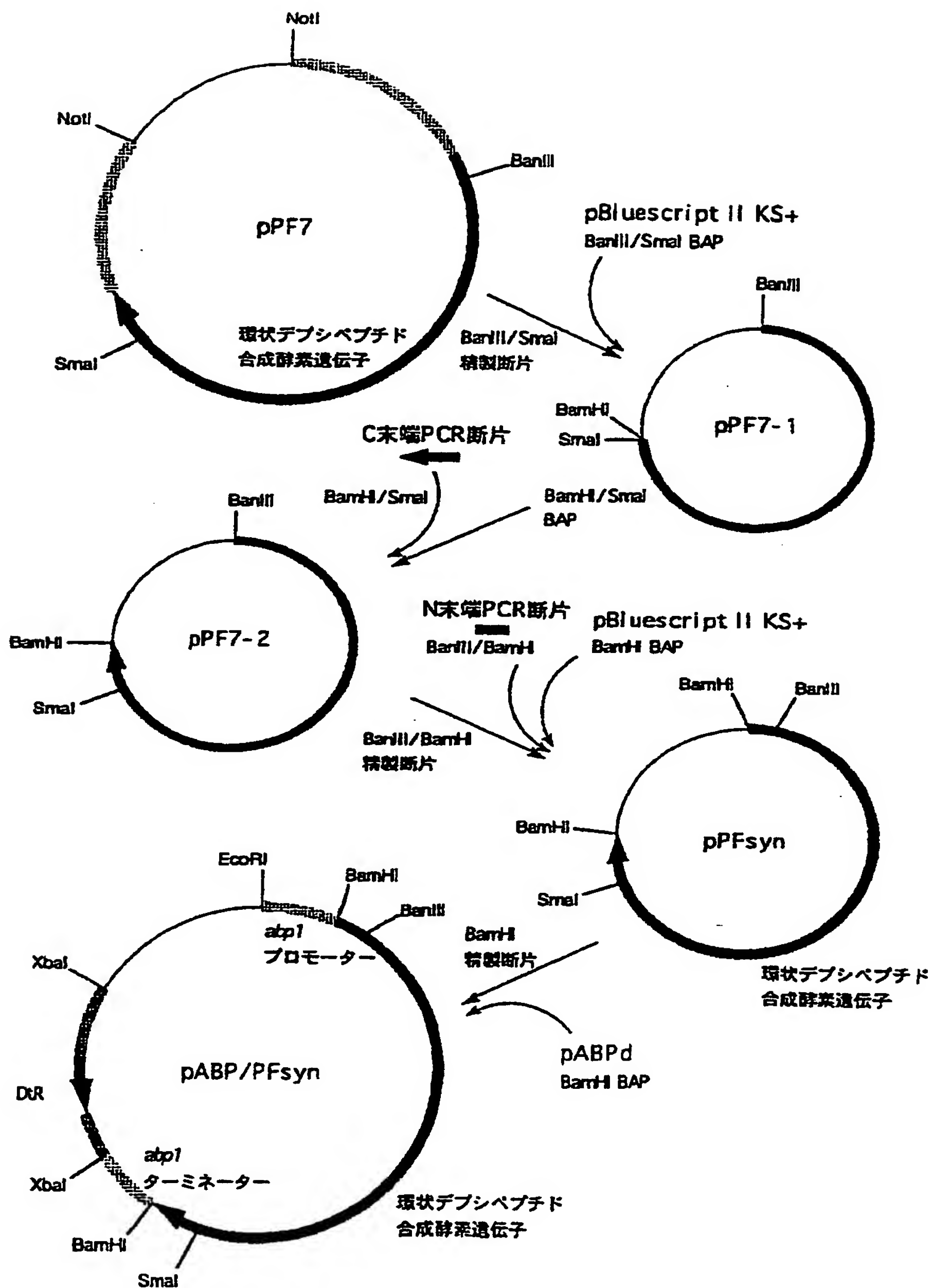


FIG. 1

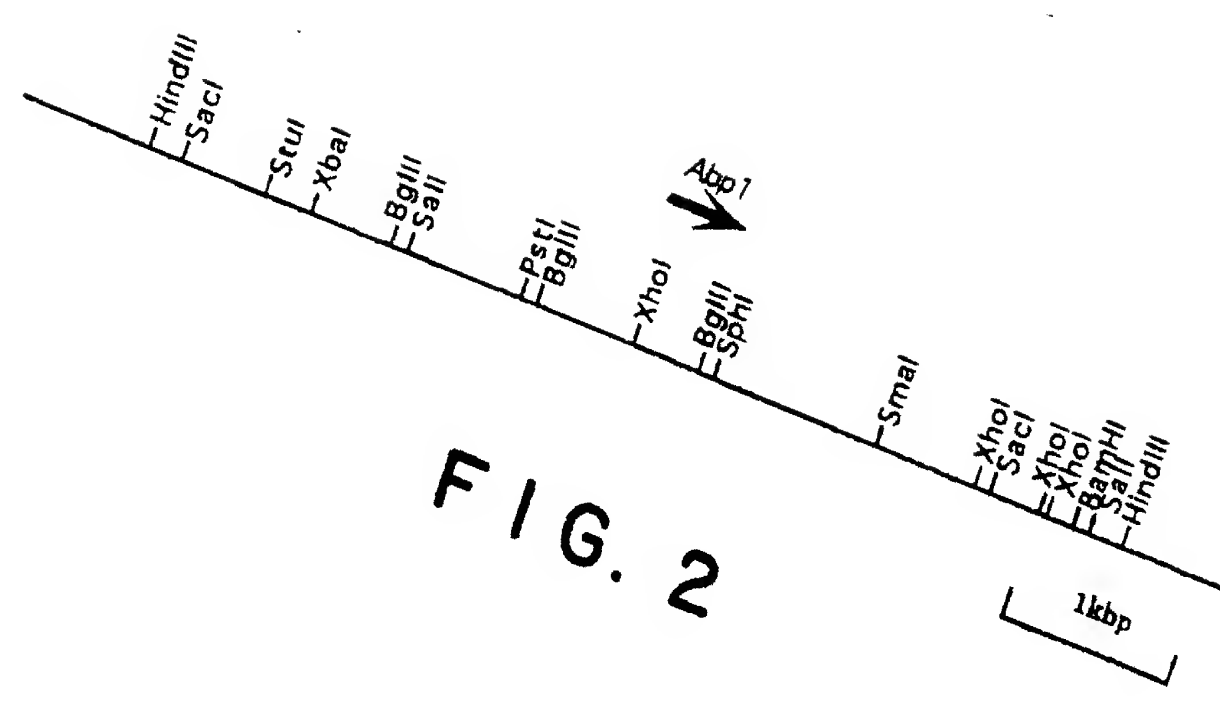


FIG. 2

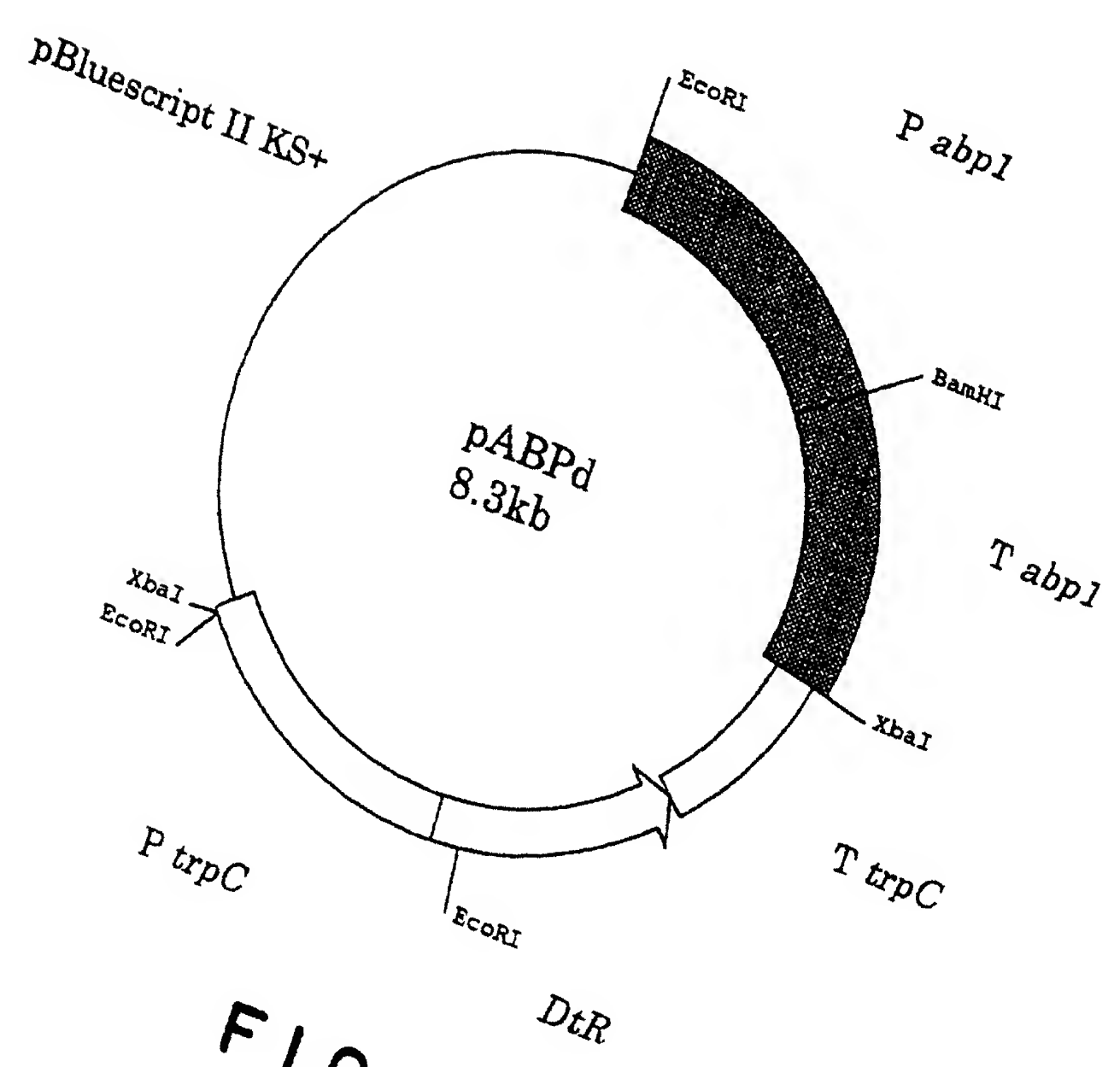


FIG. 3

3/4

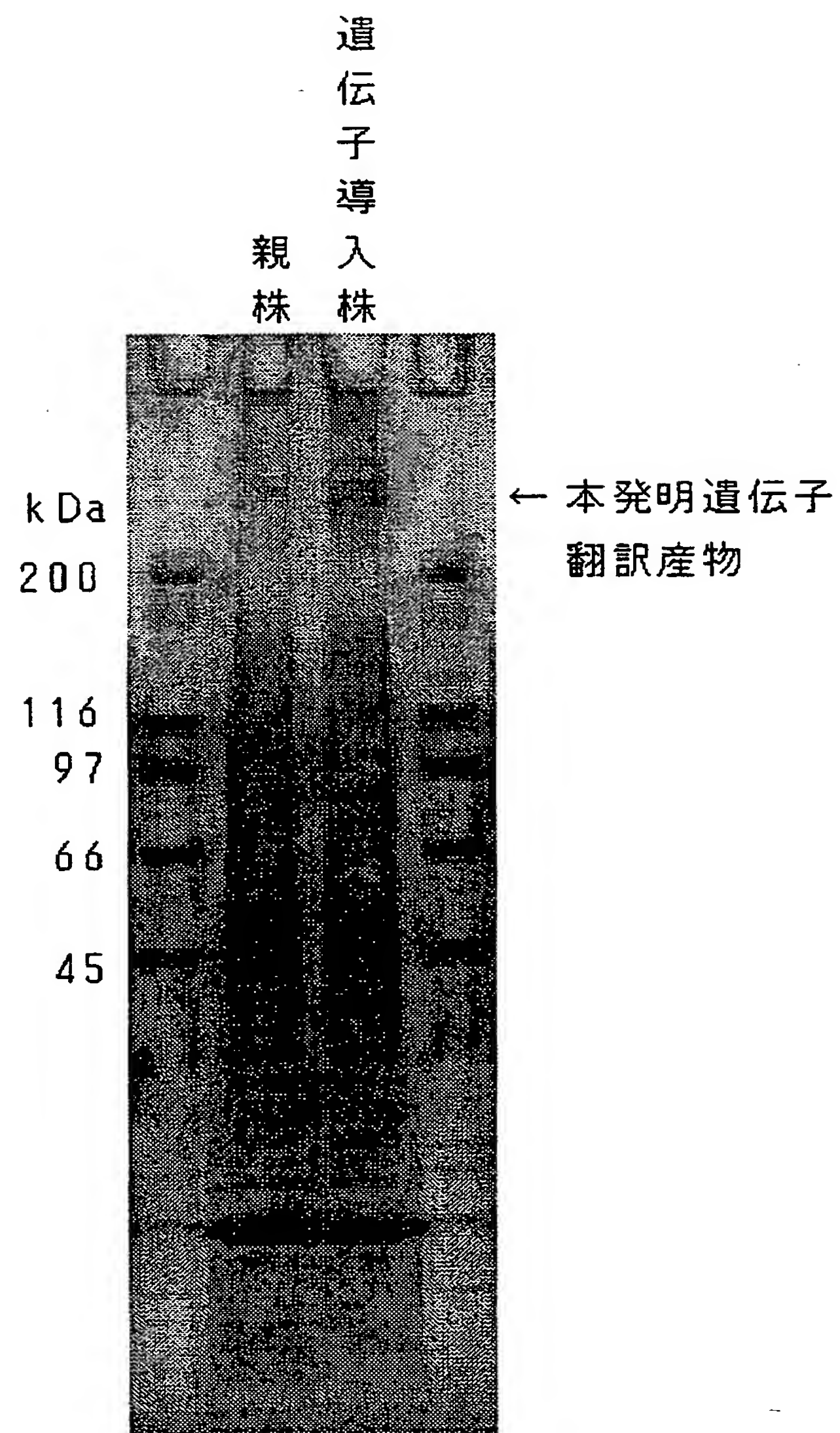


FIG. 4



4/4

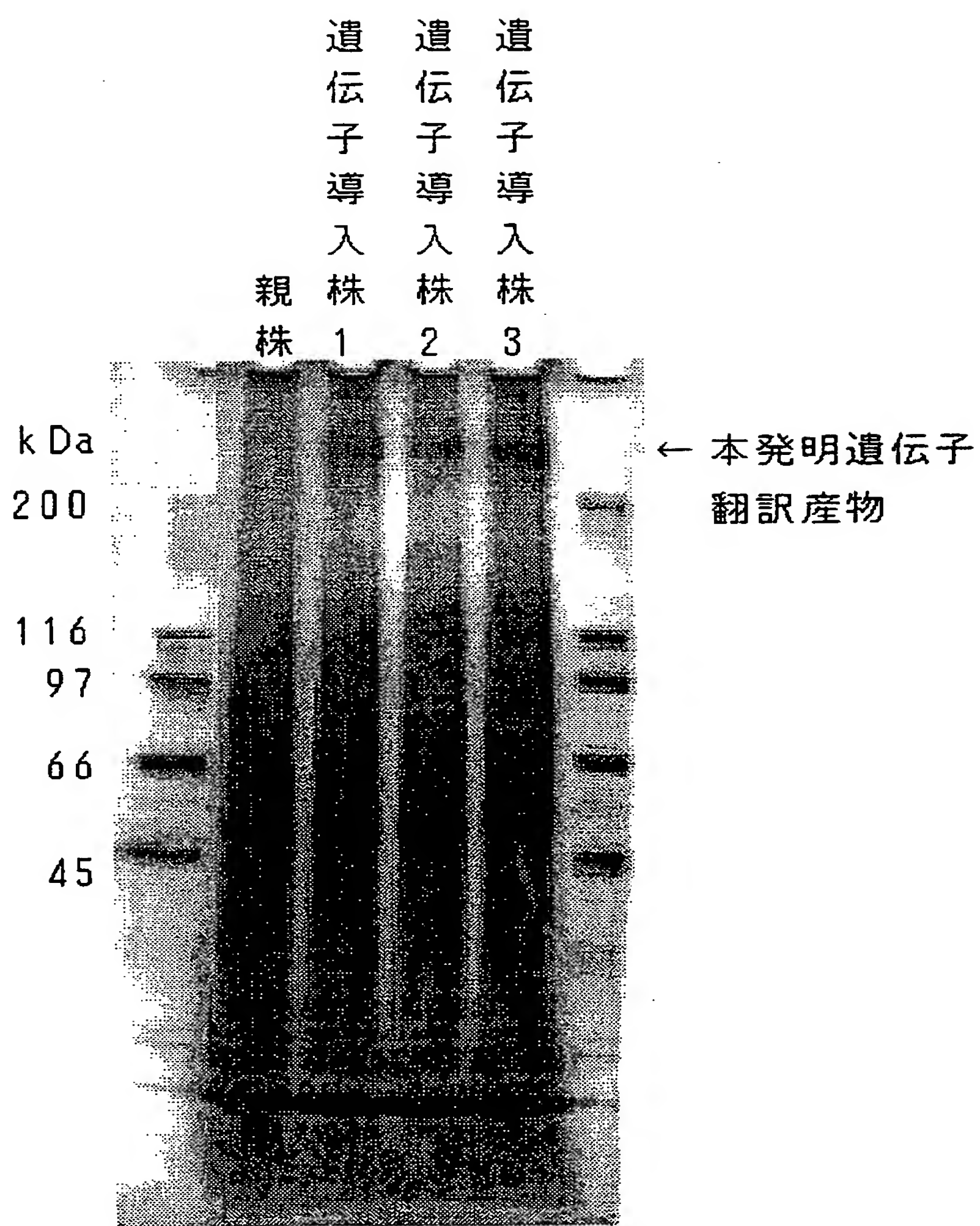


FIG. 5

## SEQUENCE LISTING

<110> Meiji Seika Kaisha, Ltd.

<120> Cyclic depsipeptide synthetase and its gene and mass production system of cyclic depsipeptide

<130> 127184

<150> JP 253040/1999

<151> 1999-09-07

<150> JP 104291/2000

<151> 2000-04-06

<160> 21

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 9633

<212> DNA

<213> Mycelia sterilia

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(9633)

<223> peptide synthetase for PF1022

<220>

2/60

&lt;221&gt; mat\_peptide

&lt;222&gt; (13)..(9630)

&lt;400&gt; 1

atg tca aac atg gca cca ctc cct acg atg ggc gtt gag cag caa gcc 48

Met Ser Asn Met Ala Pro Leu Pro Thr Met Gly Val Glu Gln Gln Ala

-1 1 5 10

cta tca ctt tca tgc ccc tta ctc cct cat gac gat gag aaa cac tca 96

Leu Ser Leu Ser Cys Pro Leu Leu Pro His Asp Asp Glu Lys His Ser

15 20 25

gac aac ctt tac gag caa gca act cgg cac ttc ggc ttg agc cga gac 144

Asp Asn Leu Tyr Glu Gln Ala Thr Arg His Phe Gly Leu Ser Arg Asp

30 35 40

aag atc gaa aat gtc tta cca tgt act tcc ttt caa tgt gat gtc ata 192

Lys Ile Glu Asn Val Leu Pro Cys Thr Ser Phe Gln Cys Asp Val Ile

45 50 55 60

gat tgc gcc gtc gac gat cgg cgg cat gct atc ggt cac gtc gtc tat 240

Asp Cys Ala Val Asp Asp Arg Arg His Ala Ile Gly His Val Val Tyr

65 70 75

gat atc ccc aat aca gtg gac atc cag cgt tta gcc gca gcc tgg aaa 288

Asp Ile Pro Asn Thr Val Asp Ile Gln Arg Leu Ala Ala Ala Trp Lys

80 85 90

gag gtt gtg cgg cag aca cca atc ttg agg acc ggc atc ttt aca tca 336

Glu Val Val Arg Gln Thr Pro Ile Leu Arg Thr Gly Ile Phe Thr Ser -  
95 100 105

gaa acc ggc gac tct ttt cag atc gtc ttg aaa gaa ggc tgc cta ccg 384  
Glu Thr Gly Asp Ser Phe Gln Ile Val Leu Lys Glu Gly Cys Leu Pro  
110 115 120

tgg atg tac gcg aca tgt ctc ggc atg aag ggg gca gtg ata caa gat 432  
Trp Met Tyr Ala Thr Cys Leu Gly Met Lys Gly Ala Val Ile Gln Asp  
125 130 135 140

gaa gca gtc gcc gct atg act gga ccg cgt tgc aat cga tat gtc gtc 480  
Glu Ala Val Ala Ala Met Thr Gly Pro Arg Cys Asn Arg Tyr Val Val  
145 150 155

ctg gag gac ccg agt acg aag caa agg ctg ctc atc tgg aca ttc agc 528  
Leu Glu Asp Pro Ser Thr Lys Gln Arg Leu Leu Ile Trp Thr Phe Ser  
160 165 170

cat gct tta gtg gat tat aca gtc cag gaa cgc atc ctt cag cgg gtt 576  
His Ala Leu Val Asp Tyr Thr Val Gln Glu Arg Ile Leu Gln Arg Val  
175 180 185

ctc aca gta tac gac ggc cgg gac gtc gag tgc cct cgc atc aag gat 624  
Leu Thr Val Tyr Asp Gly Arg Asp Val Glu Cys Pro Arg Ile Lys Asp  
190 195 200

aca gaa cat gtc tct cgg ttt tgg caa caa cac ttt gaa ggc tta gat 672  
 Thr Glu His Val Ser Arg Phe Trp Gln Gln His Phe Glu Gly Leu Asp  
 205 210 215 220

gcc tcc gta ttt ccc ctt cta cca tct cac cta act gtg tgc aat ccc 720  
 Ala Ser Val Phe Pro Leu Leu Pro Ser His Leu Thr Val Cys Asn Pro  
 225 230 235

aat gcg cgc gca gaa cat cat atc tca tac acg gga cca gtc cag agg 768  
 Asn Ala Arg Ala Glu His His Ile Ser Tyr Thr Gly Pro Val Gln Arg  
 240 245 250

aag tgg tcc cat aca agt atc tgt cgg gct gca ctc gca gtt ctt cta 816  
 Lys Trp Ser His Thr Ser Ile Cys Arg Ala Ala Leu Ala Val Leu Leu  
 255 260 265

tct cgc ttt aca cac tct tcg gag gcc ctc ttc ggt gtt gtg aca gaa 864  
 Ser Arg Phe Thr His Ser Ser Glu Ala Leu Phe Gly Val Val Thr Glu  
 270 275 280

caa tct cac aac tcc gag gac caa aga cgg tca att gat ggc ccc gca 912  
 Gln Ser His Asn Ser Glu Asp Gln Arg Arg Ser Ile Asp Gly Pro Ala  
 285 290 295 300

agg aca gta gtg cct atc cgc gtc ctt tgt gcc cca gat caa tat gtg 960  
 Arg Thr Val Val Pro Ile Arg Val Leu Cys Ala Pro Asp Gln Tyr Val  
 305 310 315



tcg gat gtc att ggg gca atc acc gca cac gaa cac gcc atg cgc ggg 1008

Ser Asp Val Ile Gly Ala Ile Thr Ala His Glu His Ala Met Arg Gly

320

325

330

ttt gag cac gct gga ctt cgc aat atc cgc cgt acc gga gac gac ggg 1056

Phe Glu His Ala Gly Leu Arg Asn Ile Arg Arg Thr Gly Asp Asp Gly

335

340

345

tct gct gct tgt gga ttc cag acc gtg cta ctg gtg act gac ggt gat 1104

Ser Ala Ala Cys Gly Phe Gln Thr Val Leu Leu Val Thr Asp Gly Asp

350

355

360

gct ccc aag acc cct ggg agt gta ctt cat cga agt gta gaa gaa tcg 1152

Ala Pro Lys Thr Pro Gly Ser Val Leu His Arg Ser Val Glu Glu Ser

365

370

375

380

gat aga ttc atg ccc tgc gct aat cgt gcc ctt ctg ctc gac tgc cag 1200

Asp Arg Phe Met Pro Cys Ala Asn Arg Ala Leu Leu Leu Asp Cys Gln

385

390

395

atg gct ggc aac tcg gca tcc cta gtc gca cga tat gat cat aat gtg 1248

Met Ala Gly Asn Ser Ala Ser Leu Val Ala Arg Tyr Asp His Asn Val

400

405

410

atc gac cca cgc cag atg tct cgc ttc ctg cga cag cta gga tac ctg 1296

Ile Asp Pro Arg Gln Met Ser Arg Phe Leu Arg Gln Leu Gly Tyr Leu

415

420

425

atc caa caa ttt cat cat cac gtc gat ctg cct ctg gtc aaa gaa ctg 1344

Ile Gln Gln Phe His His His Val Asp Leu Pro Leu Val Lys Glu Leu

430

435

440

gac gtc gtg acg gcg gag gat tgt gcg gaa atc gag aaa tgg aat tca 1392

Asp Val Val Thr Ala Glu Asp Cys Ala Glu Ile Glu Lys Trp Asn Ser

445

450

455

460

gaa cgc cta aca atg caa gac gcc tta atc cac gac acc ata tcc aag 1440

Glu Arg Leu Thr Met Gln Asp Ala Leu Ile His Asp Thr Ile Ser Lys

465

470

475

tgg gct gct ggc gat ccc aac aaa gct gca gtt ttc gct tgg gat ggg 1488

Trp Ala Ala Gly Asp Pro Asn Lys Ala Ala Val Phe Ala Trp Asp Gly

480

485

490

gaa tgg aca tac gcc gag cta gac aac ata tcc tcc cgt ctc gcc gtg 1536

Glu Trp Thr Tyr Ala Glu Leu Asp Asn Ile Ser Ser Arg Leu Ala Val

495

500

505

tat atc caa tcc ctg gac ttg aga cca gga caa gca ata ctc cca ctc 1584

Tyr Ile Gln Ser Leu Asp Leu Arg Pro Gly Gln Ala Ile Leu Pro Leu

510

515

520

tgc ttc gag aag tca aaa tgg gtc gtc gcc aca att ctc gcc gtc ctc 1632

Cys Phe Glu Lys Ser Lys Trp Val Val Ala Thr Ile Leu Ala Val Leu

525

530

535

540

aaa gtc ggt cgg gca ttc aca ctc atc gac ccg tgc gac ccc tcg gca 1680

Lys Val Gly Arg Ala Phe Thr Leu Ile Asp Pro Cys Asp Pro Ser Ala

545

550

555

agg atg gcc cag gtc tgt cag cag acc tcc gcc aca gtc gct ctc acc 1728

Arg Met Ala Gln Val Cys Gln Gln Thr Ser Ala Thr Val Ala Leu Thr

560

565

570

tcc aaa ctc cac aac acc acc tta cgt tcc gtc gtt tcc cgc tgc att 1776

Ser Lys Leu His Asn Thr Thr Leu Arg Ser Val Val Ser Arg Cys Ile

575

580

585

gtg gtc gac gac gac ctc ctt cgg tcc tta ccc cac gcc gat ggc cgc 1824

Val Val Asp Asp Asp Leu Leu Arg Ser Leu Pro His Ala Asp Gly Arg

590

595

600

tta aag gcc acc gtg aag cca cag gac ttg gcc tat gtt att ttc aca 1872

Leu Lys Ala Thr Val Lys Pro Gln Asp Leu Ala Tyr Val Ile Phe Thr

605

610

615

620

tct ggc agc aca gga gag ccg aaa ggc atc atg atc gaa cat cgg ggg 1920

Ser Gly Ser Thr Gly Glu Pro Lys Gly Ile Met Ile Glu His Arg Gly

625

630

635

ttc gtg tcg tgt gct atg aaa ttt ggc ccc gcg ctc gga atg gat gag 1968

Phe Val Ser Cys Ala Met Lys Phe Gly Pro Ala Leu Gly Met Asp Glu

640

645

650

cac acg cgc gct ctt caa ttc gcc tca tat gcg ttt ggc gct tgt ctg 2016

His Thr Arg Ala Leu Gln Phe Ala Ser Tyr Ala Phe Gly Ala Cys Leu

655

660

665

gta gaa gtt gtg aca gct ctg atg cac ggc ggc tgc gtc tgc atc cct 2064

Val Glu Val Val Thr Ala Leu Met His Gly Gly Cys Val Cys Ile Pro

670

675

680

tcc gat gac gat cgc ttg aac aat gta ccg gag ttc atc aaa agg gcc 2112

Ser Asp Asp Asp Arg Leu Asn Asn Val Pro Glu Phe Ile Lys Arg Ala

685

690

695

700

cag gtg aac tgg gtg ata ctc act ccg tcg tat atc ggg aca ttc cag 2160

Gln Val Asn Trp Val Ile Leu Thr Pro Ser Tyr Ile Gly Thr Phe Gln

705

710

715

ccg gaa gat gtc cct gga cta caa aca ctg gta ttg gtt gga gaa cct 2208

Pro Glu Asp Val Pro Gly Leu Gln Thr Leu Val Leu Val Gly Glu Pro

720

725

730

atc tca gcg tct att cgg gat acc tgg gcc tcc cag gtt cga ctc ctg 2256

Ile Ser Ala Ser Ile Arg Asp Thr Trp Ala Ser Gln Val Arg Leu Leu

735

740

745

aat gcc tac ggt cag agt gaa agc tca act atg tgc agc gtc acg gaa 2304

Asn Ala Tyr Gly Gln Ser Glu Ser Ser Thr Met Cys Ser Val Thr Glu

750

755

760

9/60

gtc agc ccg ctc tcc ctc gaa ccg aac aat atc ggt cgg gct gta ggc 2352  
 Val Ser Pro Leu Ser Leu Glu Pro Asn Asn Ile Gly Arg Ala Val Gly  
 765 770 775 780

gca cga tcc tgg atc att gat ccc gac gag cct gat cgt ctt gct cca 2400  
 Ala Arg Ser Trp Ile Ile Asp Pro Asp Glu Pro Asp Arg Leu Ala Pro  
 785 790 795

att ggc tgc att gga gag cta gtg atc gaa agt ccg ggc att gcg cgc 2448  
 Ile Gly Cys Ile Gly Glu Leu Val Ile Glu Ser Pro Gly Ile Ala Arg  
 800 805 810

gac tat atc atc gcg ccg ccg ccg gac aag tcc ccc ttt ctc cta gca 2496  
 Asp Tyr Ile Ile Ala Pro Pro Pro Asp Lys Ser Pro Phe Leu Leu Ala  
 815 820 825

ccc ccg gcc tgg tat cca gcc ggg aaa tta tcc aac gcc ttt aaa ttt 2544  
 Pro Pro Ala Trp Tyr Pro Ala Gly Lys Leu Ser Asn Ala Phe Lys Phe  
 830 835 840

tac aag act gga gat ctc gtg cgt tat gga cct gac ggc acc atc gtc 2592  
 Tyr Lys Thr Gly Asp Leu Val Arg Tyr Gly Pro Asp Gly Thr Ile Val  
 845 850 855 860

tgc ctg gga cgc aaa gat tcg caa gtg aag atc cga ggg cag cgc gta 2640  
 Cys Leu Gly Arg Lys Asp Ser Gln Val Lys Ile Arg Gly Gln Arg Val  
 865 870 875



10/60

gag atc agc gca gtg gaa gcc agt cta cga cga caa cta cct agt gac - 2688

Glu Ile Ser Ala Val Glu Ala Ser Leu Arg Arg Gln Leu Pro Ser Asp

880

885

890

atc atg ccc gtg gcc gaa gct atc aaa cgc tcg gat tcg tca ggc agc 2736

Ile Met Pro Val Ala Glu Ala Ile Lys Arg Ser Asp Ser Ser Gly Ser

895

900

905

aca gtc ttg act gcc ttc ttg ata ggg tca tct aag agc gga gat ggt 2784

Thr Val Leu Thr Ala Phe Leu Ile Gly Ser Ser Lys Ser Gly Asp Gly

910

915

920

aat ggc cac gct tta tct gcg gca gac gcc gtt atc ttg gat cac ggt 2832

Asn Gly His Ala Leu Ser Ala Ala Asp Ala Val Ile Leu Asp His Gly

925

930

935

940

gct acc aac gag ata aac gcg aag ttg cag caa atc ctt ccc cag cat 2880

Ala Thr Asn Glu Ile Asn Ala Lys Leu Gln Gln Ile Leu Pro Gln His

945

950

955

tcc gtt cca tcc tat tat atc cac atg gaa aat ctt cct cga act gcc 2928

Ser Val Pro Ser Tyr Tyr Ile His Met Glu Asn Leu Pro Arg Thr Ala

960

965

970

acc ggc aaa gcg gac agg aaa atg ctt cga tct att gct agc aag cta 2976

Thr Gly Lys Ala Asp Arg Lys Met Leu Arg Ser Ile Ala Ser Lys Leu

975

980

985

11/60

ttg ggt gaa ttg tct cag aac gtg aca tct caa ccg att gag aag cac 3024  
 Leu Gly Glu Leu Ser Gln Asn Val Thr Ser Gln Pro Ile Glu Lys His

990

995

1000

gat gcc cca gca act ggt ata gag gtc aag ctg aag gag ctt tgg ttt 3072  
 Asp Ala Pro Ala Thr Gly Ile Glu Val Lys Leu Lys Glu Leu Trp Phe

1005

1010

1015

1020

ctg agc ttg aat ctt aat ccc aac tct caa gat gtc gga gcg agt ttc 3120  
 Leu Ser Leu Asn Leu Asn Pro Asn Ser Gln Asp Val Gly Ala Ser Phe

1025

1030

1035

ttt gac tta ggc gga aat tcc att atc gcc atc aaa atg gta aac atg 3168  
 Phe Asp Leu Gly Gly Asn Ser Ile Ile Ala Ile Lys Met Val Asn Met

1040

1045

1050

gcg agg tca gct ggg ata gca ctg aag gta tcc gac ata ttc cag aat 3216  
 Ala Arg Ser Ala Gly Ile Ala Leu Lys Val Ser Asp Ile Phe Gln Asn

1055

1060

1065

ccc acg ctc gcc ggc ctt gtg gat gtc atc ggg cga gac ccg gct ccg 3264  
 Pro Thr Leu Ala Gly Leu Val Asp Val Ile Gly Arg Asp Pro Ala Pro

1070

1075

1080

tac aac ctc atc cca aca aca gca tac agc gga cct gtt gag cag tcg 3312  
 Tyr Asn Leu Ile Pro Thr Thr Ala Tyr Ser Gly Pro Val Glu Gln Ser

1085

1090

1095

1100

12/60

ttc gcc cag ggc cgt cta tgg ttc ttg gac cag atc gaa ctc gat gcg 3360  
Phe Ala Gln Gly Arg Leu Trp Phe Leu Asp Gln Ile Glu Leu Asp Ala  
1105 1110 1115

ttg tgg tac ctt cta cca tac gcc gtt cgc atg cgc ggg cca ttg cat 3408  
Leu Trp Tyr Leu Leu Pro Tyr Ala Val Arg Met Arg Gly Pro Leu His  
1120 1125 1130

att gat gcg ctc act att gcg ttg cta gct ata cag caa cga cat gaa 3456  
Ile Asp Ala Leu Thr Ile Ala Leu Leu Ala Ile Gln Gln Arg His Glu  
1135 1140 1145

acc ttg cgg aca acc ttt gag gag cag gac ggc gta ggc gtt cag gtt 3504  
Thr Leu Arg Thr Thr Phe Glu Glu Gln Asp Gly Val Gly Val Gln Val  
1150 1155 1160

gtc cat gcg agc ccc atc tcc gac ttg agg ata atc gac gta tca ggc 3552  
Val His Ala Ser Pro Ile Ser Asp Leu Arg Ile Ile Asp Val Ser Gly  
1165 1170 1175 1180

gac cga aac agt gac tac ctc cag ttg cta cac caa gag cag acg act 3600  
Asp Arg Asn Ser Asp Tyr Leu Gln Leu Leu His Gln Glu Gln Thr Thr  
1185 1190 1195

cca ttc att cta gca tgt cag gca gga tgg agg gta tca ctg att aga 3648  
Pro Phe Ile Leu Ala Cys Gln Ala Gly Trp Arg Val Ser Leu Ile Arg  
1200 1205 1210

cta gga gaa gat gat cac atc ctc tct atc gta atg cat cac atc atc 3696  
Leu Gly Glu Asp Asp His Ile Leu Ser Ile Val Met His His Ile Ile

1215

1220

1225

tcc gac ggc tgg tct atc gac att cta cgc cgg gaa cta agc aat ttc 3744  
Ser Asp Gly Trp Ser Ile Asp Ile Leu Arg Arg Glu Leu Ser Asn Phe

1230

1235

1240

tat tca gcc gct ctc cgg ggc tct gat cct cta tcg gtg gtg agc cca 3792  
Tyr Ser Ala Ala Leu Arg Gly Ser Asp-Pro Leu Ser Val Val Ser Pro

1245

1250

1255

1260

ctc cca ctc cac tac cgc gac ttt tcc gtt tgg caa aag cag gtc gaa 3840  
Leu Pro Leu His Tyr Arg Asp Phe Ser Val Trp Gln Lys Gln Val Glu

1265

1270

1275

cag gag acc gaa cat gag cgg caa ctc gaa tac tgg gtc aag cag ctc 3888  
Gln Glu Thr Glu His Glu Arg Gln Leu Glu Tyr Trp Val Lys Gln Leu

1280

1285

1290

gca gac agc tcg gcc gcc gaa ttc cta acc gac ttc ccc cga ccc aac 3936  
Ala Asp Ser Ser Ala Ala Glu Phe Leu Thr Asp Phe Pro Arg Pro Asn

1295

1300

1305

ata ctg tcc ggt gaa gca ggt tcc gtg cca gtg acg atc gaa ggc gaa 3984  
Ile Leu Ser Gly Glu Ala Gly Ser Val Pro Val Thr Ile Glu Gly Glu

1310

1315

1320

ctg tat gaa agg ctc caa gaa ttc tgt aaa gta gag caa atg acg cct 4032  
Leu Tyr Glu Arg Leu Gln Glu Phe Cys Lys Val Glu Gln Met Thr Pro  
1325 1330 1335 1340

ttc gcc gtg ttg tta ggg gcc ttc cgc gcg acc cat tat cgt ctc acc 4080  
Phe Ala Val Leu Leu Gly Ala Phe Arg Ala Thr His Tyr Arg Leu Thr  
1345 1350 1355

ggc gcc gaa gac tcg atc atc ggc acg ccc atc gcg aac cgc aac cgc 4128  
Gly Ala Glu Asp Ser Ile Ile Gly Thr Pro Ile Ala Asn Arg Asn Arg  
1360 1365 1370

cag gag ctt gaa aac atg atc ggc ttc ttc gtc aac acc caa tgc atg 4176  
Gln Glu Leu Glu Asn Met Ile Gly Phe Phe Val Asn Thr Gln Cys Met  
1375 1380 1385

cga atc acg gtc gac ggc gac gac act ttt gaa agc ctg gtg cga caa 4224  
Arg Ile Thr Val Asp Gly Asp Asp Thr Phe Glu Ser Leu Val Arg Gln  
1390 1395 1400

gtt cgg acc acg gcg acg gcg gca ttc gag cac caa gac gtc ccc ttt 4272  
Val Arg Thr Thr Ala Thr Ala Ala Phe Glu His Gln Asp Val Pro Phe  
1405 1410 1415 1420

gag cgc gtc gtg acg gca ctc ctt cca cgc tcg aga gac cta tcc cga 4320  
Glu Arg Val Val Thr Ala Leu Leu Pro Arg Ser Arg Asp Leu Ser Arg  
1425 1430 1435



15/60

aac cca cta gca cag ctc acc ttc gct ctt cat tct caa cag gac ctc 4368  
Asn Pro Leu Ala Gln Leu Thr Phe Ala Leu His Ser Gln Gln Asp Leu

1440

1445

1450

ggc aag ttc gag ctg gag ggt ctc gta gcg gaa ccc gtc tcg aac aag 4416  
Gly Lys Phe Glu Leu Glu Gly Leu Val Ala Glu Pro Val Ser Asn Lys

1455

1460

1465

gta tac acc agg ttc gac gtg gag ttt cac ctg ttc caa gaa gcc gga 4464  
Val Tyr Thr Arg Phe Asp Val Glu Phe His Leu Phe Gln Glu Ala Gly

1470

1475

1480

aga cta agc ggt aac gtg gca ttt gcg gca gat cta ttc aag cct gag 4512  
Arg Leu Ser Gly Asn Val Ala Phe Ala Ala Asp Leu Phe Lys Pro Glu

1485

1490

1495

1500

acc att agc aat gta gtc gcc ata ttt ttc caa atc ctg cga caa ggc 4560  
Thr Ile Ser Asn Val Val Ala Ile Phe Phe Gln Ile Leu Arg Gln Gly

1505

1510

1515

att cgc cag cct cgg act cca atc gct gtt ctc ccg ctt acc gat ggg 4608  
Ile Arg Gln Pro Arg Thr Pro Ile Ala Val Leu Pro Leu Thr Asp Gly

1520

1525

1530

tta gcg gac ctt cgt gcc atg ggc ttg ctt gag atc gag aag gca gaa 4656  
Leu Ala Asp Leu Arg Ala Met Gly Leu Leu Glu Ile Glu Lys Ala Glu

1535

1540

1545

16/60

tac ccg cgg gag tcg agc gtc gtc gac gtc ttc cgc aag cag gtg gcc 4704

Tyr Pro Arg Glu Ser Ser Val Val Asp Val Phe Arg Lys Gln Val Ala

1550

1555

1560

gct cac ccg cac gct ttt gcc gtt gtc gat tcg gca tcg cgc ctc aca 4752

Ala His Pro His Ala Phe Ala Val Val Asp Ser Ala Ser Arg Leu Thr

1565

1570

1575

1580

tat gct gat ctc gat cgt caa tcc gat caa ctc gcg acc tgg ctc ggt 4800

Tyr Ala Asp Leu Asp Arg Gln Ser Asp Gln Leu Ala Thr Trp Leu Gly

1585

1590

1595

cgg cgc aat atg acg gct gag acg ctg gtc ggg gtg tta gca ccg cgg 4848

Arg Arg Asn Met Thr Ala Glu Thr Leu Val Gly Val Leu Ala Pro Arg

1600

1605

1610

tca tgt caa aca gtt gtt gcc att tta ggt atc ctg aaa gcg aat ctc 4896

Ser Cys Gln Thr Val Val Ala Ile Leu Gly Ile Leu Lys Ala Asn Leu

1615

1620

1625

gca tat ctc ccg ctt gat gtg aat tgt cct acc gcc cgc ctg caa aca 4944

Ala Tyr Leu Pro Leu Asp Val Asn Cys Pro Thr Ala Arg Leu Gln Thr

1630

1635

1640

atc cta tct aca ttg aat cgg cac aag ttg gtc cta ctc ggc tct aac 4992

Ile Leu Ser Thr Leu Asn Arg His Lys Leu Val Leu Leu Gly Ser Asn

1645

1650

1655

1660

17/60

gca act act ccg gat gtc cag ata cct gat gta gag ctg gta cga atc 5040

Ala Thr Thr Pro Asp Val Gln Ile Pro Asp Val Glu Leu Val Arg Ile

1665

1670

1675

agc gat atc tta gat cgc ccc atc aat ggc cag gca aag cta aat ggt 5088

Ser Asp Ile Leu Asp Arg Pro Ile Asn Gly Gln Ala Lys Leu Asn Gly

1680

1685

1690

cat aca aaa tcg aat ggc tac tca aag cca aac ggc tat acg cat ctg 5136

His Thr Lys Ser Asn Gly Tyr Ser Lys Pro Asn Gly Tyr Thr His Leu

1695

1700

1705

aaa ggc tat tca aac cta aac ggt tat tca aaa caa aat ggt tat gca 5184

Lys Gly Tyr Ser Asn Leu Asn Gly Tyr Ser Lys Gln Asn Gly Tyr Ala

1710

1715

1720

caa ctc aac ggc cat aga gag cgt aac aat tat tta gat cta aat ggg 5232

Gln Leu Asn Gly His Arg Glu Arg Asn Asn Tyr Leu Asp Leu Asn Gly

1725

1730

1735

1740

cac tca ctg cta aat ggg aat tca gac atc acc aca tca ggg ccc tca 5280

His Ser Leu Leu Asn Gly Asn Ser Asp Ile Thr Thr Ser Gly Pro Ser

1745

1750

1755

gca aca agc ctt gcc tac gtg atc ttc aca tcc ggc tca acc gga aag 5328

Ala Thr Ser Leu Ala Tyr Val Ile Phe Thr Ser Gly Ser Thr Gly Lys

1760

1765

1770

ccc aaa gga gtc atg gtc gaa cac cgc agc atc atc cga ctt gca aag 5376

Pro Lys Gly Val Met Val Glu His Arg Ser Ile Ile Arg Leu Ala Lys

1775

1780

1785

aag aac aga atc ata tcc agg ttc cca tct gta gcc aag gta gct cac 5424

Lys Asn Arg Ile Ile Ser Arg Phe Pro Ser Val Ala Lys Val Ala His

1790

1795

1800

ctc tca aac atc gcc ttt gac gcc gcc act tgg gaa atg ttc gca gcc 5472

Leu Ser Asn Ile Ala Phe Asp Ala Ala Thr Trp Glu Met Phe Ala Ala

1805

1810

1815

1820

ctt cta aac ggc gga acg ctg gtc tgt atc gac tat atg acc acc ctg 5520

Leu Leu Asn Gly Gly Thr Leu Val Cys Ile Asp Tyr Met Thr Thr Leu

1825

1830

1835

gac agc aaa acg ctc gag gcc gcg ttt gca cga gaa caa atc aac gcc 5568

Asp Ser Lys Thr Leu Glu Ala Ala Phe Ala Arg Glu Gln Ile Asn Ala

1840

1845

1850

gcg tta ctc acg ccc gct ttg ttg aag cag tgc cta gcc aac att ccc 5616

Ala Leu Leu Thr Pro Ala Leu Leu Lys Gln Cys Leu Ala Asn Ile Pro

1855

1860

1865

act acc cta ggc agg ctg agt gca ctc gtt att gga ggt gat agg ctt 5664

Thr Thr Leu Gly Arg Leu Ser Ala Leu Val Ile Gly Gly Asp Arg Leu

1870

1875

1880

19/60

gac ggc caa gac gcg atc gca gca cat gcg ctt gtc ggt gct ggc gtg 5712

Asp Gly Gln Asp Ala Ile Ala Ala His Ala Leu Val Gly Ala Gly Val

1885

1890

1895

1900

tat aat gcg tat ggc ccg acc gaa aac gga gtg atc agt acg att tat 5760

Tyr Asn Ala Tyr Gly Pro Thr Glu Asn Gly Val Ile Ser Thr Ile Tyr

1905

1910

1915

aat atc act aaa aac gac tcg ttc atc aac gga gtc ccc atc ggc tgt 5808

Asn Ile Thr Lys Asn Asp Ser Phe Ile Asn Gly Val Pro Ile Gly Cys

1920

1925

1930

gca atc agc aat tcc ggc gcc tac atc aca gac cca gac cag cag ctc 5856

Ala Ile Ser Asn Ser Gly Ala Tyr Ile Thr Asp Pro Asp Gln Gln Leu

1935

1940

1945

gta cct cct ggc gtc atg ggt gaa ctc gtc gtt acc ggt gac ggg ctc 5904

Val Pro Pro Gly Val Met Gly Glu Leu Val Val Thr Gly Asp Gly Leu

1950

1955

1960

gcg cgg ggg tat aca gac cca gca cta gac gcg ggc cgc ttc gtc cag 5952

Ala Arg Gly Tyr Thr Asp Pro Ala Leu Asp Ala Gly Arg Phe Val Gln

1965

1970

1975

1980

atc atg atc aat gac aag gcc gtg agg gcg tac cga acg ggt gac cgg 6000

Ile Met Ile Asn Asp Lys Ala Val Arg Ala Tyr Arg Thr Gly Asp Arg

1985

1990

1995



20/60

gca cga tat cgc gta gga gac ggt cag atc gag ttc ttc gga cgc atg 6048

Ala Arg Tyr Arg Val Gly Asp Gly Gln Ile Glu Phe Phe Gly Arg Met

2000

2005

2010

gat cag caa gtc aag atc cga ggt cac cgc att gaa cca gcc gaa gtg 6096

Asp Gln Gln Val Lys Ile Arg Gly His Arg Ile Glu Pro Ala Glu Val

2015

2020

2025

gag cgt gct att ctc gac caa gac tcg gcc cgc gac gcc gtc gtt gtc 6144

Glu Arg Ala Ile Leu Asp Gln Asp Ser Ala Arg Asp Ala Val Val Val

2030

2035

2040

atc cgg cac caa gaa ggt gaa gaa ccg gag atg gtt ggt ttc gtc gcg 6192

Ile Arg His Gln Glu Gly Glu Glu Pro Glu Met Val Gly Phe Val Ala

2045

2050

2055

2060

acc cac ggc gat cac tct gcc gaa caa gag gaa gca gac gac cag gtt 6240

Thr His Gly Asp His Ser Ala Glu Gln Glu Glu Ala Asp Asp Gln Val

2065

2070

2075

gaa ggt tgg aaa gac ttc ttc gag agc aat aca tat gcc gac atg gat 6288

Glu Gly Trp Lys Asp Phe Phe Glu Ser Asn Thr Tyr Ala Asp Met Asp

2080

2085

2090

acc atc ggc cag tct gct ata ggc aac gac ttt acg ggc tgg acg tcc 6336

Thr Ile Gly Gln Ser Ala Ile Gly Asn Asp Phe Thr Gly Trp Thr Ser

2095

2100

2105

atg tac gac ggg agc gag atc aac aag gcc gag atg cag gag tgg ctc 6384

Met Tyr Asp Gly Ser Glu Ile Asn Lys Ala Glu Met Gln Glu Trp Leu

2110

2115

2120

gac gac acc atg cgc aca ctc ctc gat ggc caa gcg ccg ggt cac gta 6432

Asp Asp Thr Met Arg Thr Leu Leu Asp Gly Gln Ala Pro Gly His Val

2125

2130

2135

2140

ctc gaa ata ggc aca ggc agt ggc atg gta ttg ttt aac tta ggg gcc 6480

Leu Glu Ile Gly Thr Gly Ser Gly Met Val Leu Phe Asn Leu Gly Ala

2145

2150

2155

ggg cta caa agc tac gta ggt ctt gaa cca tct aga tct gca gcc acg 6528

Gly Leu Gln Ser Tyr Val Gly Leu Glu Pro Ser Arg Ser Ala Ala Thr

2160

2165

2170

ttt gtt acc aaa gcg atc aat tcc acc cca gct ctt gca gga aag gcc 6576

Phe Val Thr Lys Ala Ile Asn Ser Thr Pro Ala Leu Ala Gly Lys Ala

2175

2180

2185

gaa gtg cac gtc ggc aca gcg aca gac ata aac cga ctt cgt gga ctt 6624

Glu Val His Val Gly Thr Ala Thr Asp Ile Asn Arg Leu Arg Gly Leu

2190

2195

2200

cgt ccc gat cta gtt gtg ctc aac tcg gta gtc cag tat ttc ccc acg 6672

Arg Pro Asp Leu Val Val Leu Asn Ser Val Val Gln Tyr Phe Pro Thr

2205

2210

2215

2220

22/60

ccc gag tac cta cta gag gtc gtg gag agt ctc gtc cgg att ccg ggc 6720

Pro Glu Tyr Leu Leu Glu Val Val Glu Ser Leu Val Arg Ile Pro Gly

2225

2230

2235

gtc aag cgc gtg gtc ttc ggc gac ata cga tct cac gcc acg aac aga 6768

Val Lys Arg Val Val Phe Gly Asp Ile Arg Ser His Ala Thr Asn Arg

2240

2245

2250

cat ttt ctt gct gcc agg gcg ctg cat tcg ctg ggc tcc aag gcg acc 6816

His Phe Leu Ala Ala Arg Ala Leu His Ser Leu Gly Ser Lys Ala Thr

2255

2260

2265

aaa gat gct ata cgt caa aag atg acg gag atg gaa gag cgc gag gaa 6864

Lys Asp Ala Ile Arg Gln Lys Met Thr Glu Met Glu Glu Arg Glu Glu

2270

2275

2280

gag ctg ctc gtc gac ccg gcc ttc ttc acg gcg ctg ctg cag ggc cag 6912

Glu Leu Leu Val Asp Pro Ala Phe Phe Thr Ala Leu Leu Gln Gly Gln

2285

2290

2295

2300

ctt gcc gat cga atc aag cac gtc gag atc ctc ccg aag aac atg cgc 6960

Leu Ala Asp Arg Ile Lys His Val Glu Ile Leu Pro Lys Asn Met Arg

2305

2310

2315

gcc acg aac gag ctg agc gcg tac cgg tat aca gcc gtc att cac gta 7008

Ala Thr Asn Glu Leu Ser Ala Tyr Arg Tyr Thr Ala Val Ile His Val

2320

2325

2330

cgc ggc cca gag gaa cag tcg cgg ccc gtg tat ccg atc caa gtg aac 7056

Arg Gly Pro Glu Glu Gln Ser Arg Pro Val Tyr Pro Ile Gln Val Asn

2335

2340

2345

gac tgg atc gac ttt cag gcc tca cgc att gac cgc cgc gcc ctt ctc 7104

Asp Trp Ile Asp Phe Gln Ala Ser Arg Ile Asp Arg Arg Ala Leu Leu

2350

2355

2360

cga ctc cta cag cgc tcg gca gac gcc gcg acc gtc gcc gtc agc aac 7152

Arg Leu Leu Gln Arg Ser Ala Asp Ala Ala Thr Val Ala Val Ser Asn

2365

2370

2375

2380

atc ccc tac agc aag acg att gta gaa cgc cat gtc gtc gag tcc ctt 7200

Ile Pro Tyr Ser Lys Thr Ile Val Glu Arg His Val Val Glu Ser Leu

2385

2390

2395

gac aat aac aac agg gag aat acg cat aga gca cca gac ggc gcg gct 7248

Asp Asn Asn Asn Arg Glu Asn Thr His Arg Ala Pro Asp Gly Ala Ala

2400

2405

2410

tgg atc tcg gcc gtc cgc tcc aag gcc gag cgc tgc acg tcc ctc tcc 7296

Trp Ile Ser Ala Val Arg Ser Lys Ala Glu Arg Cys Thr Ser Leu Ser

2415

2420

2425

gtg acc gat ctt gtg cag ctc ggg gaa gaa gcc ggc ttt cgc gta gaa 7344

Val Thr Asp Leu Val Gln Leu Gly Glu Glu Ala Gly Phe Arg Val Glu

2430

2435

2440

gtc agc gca gcg cgg cag tgg tct caa agc ggc gcg ctc gat gcc gtc 7392  
Val Ser Ala Ala Arg Gln Trp Ser Gln Ser Gly Ala Leu Asp Ala Val  
2445 2450 2455 2460

ttt cac cgc tat aat ttg ccc act caa agc aat agt cgc gtt ctg att 7440  
Phe His Arg Tyr Asn Leu Pro Thr Gln Ser Asn Ser Arg Val Leu Ile  
2465 2470 2475

cag ttc cct acc gaa gat ggc cag acg cga aga tcc gcc act ctg aca 7488  
Gln Phe Pro Thr Glu Asp Gly Gln Thr Arg Arg Ser Ala Thr Leu Thr  
2480 2485 2490

aac cga cca cta cag cgt ctg cag agc cgt cgg ttc gca tca cag atc 7536  
Asn Arg Pro Leu Gln Arg Leu Gln Ser Arg Arg Phe Ala Ser Gln Ile  
2495 2500 2505

cgc gaa cag ctg aag gcc gtg ctc ccg tca tac atg atc ccc tcc cgc 7584  
Arg Glu Gln Leu Lys Ala Val Leu Pro Ser Tyr Met Ile Pro Ser Arg  
2510 2515 2520

atc gtg gtc ata gac cag atg cct ctc aat gcc aat ggc aag gtc gac 7632  
Ile Val Val Ile Asp Gln Met Pro Leu Asn Ala Asn Gly Lys Val Asp  
2525 2530 2535 2540

cgg aaa gaa ctt acc aga agg gcc caa atc gcg ccg aaa tct cag gcg 7680  
Arg Lys Glu Leu Thr Arg Arg Ala Gln Ile Ala Pro Lys Ser Gln Ala  
2545 2550 2555

gct ccc gcc aaa ccc gtc aaa cag gtc gat ccg ttc gtc aac ctg gaa 7728

Ala Pro Ala Lys Pro Val Lys Gln Val Asp Pro Phe Val Asn Leu Glu

2560

2565

2570

gcc att tta tgt gag gag ttc gcg gag gtg ctg ggc atg gaa gtc ggc 7776

Ala Ile Leu Cys Glu Glu Phe Ala Glu Val Leu Gly Met Glu Val Gly

2575

2580

2585

gtg aac gac cac ttc ttc caa cta ggc gga cac tct ctc ttg gcc acg 7824

Val Asn Asp His Phe Phe Gln Leu Gly Gly His Ser Leu Leu Ala Thr

2590

2595

2600

aag ctc gtc gcg cgt ctc agt cgt cgg cta aac ggt cgt gtg tct gtg 7872

Lys Leu Val Ala Arg Leu Ser Arg Arg Leu Asn Gly Arg Val Ser Val

2605

2610

2615

2620

agg gat gtg ttc gac cag cct gtg att tcc gac ctc gca gtc acc ctc 7920

Arg Asp Val Phe Asp Gln Pro Val Ile Ser Asp Leu Ala Val Thr Leu

2625

2630

2635

cgc cag gga ctg acc ttg gaa aac gcc att ccc gca acg ccg gac agc 7968

Arg Gln Gly Leu Thr Leu Glu Asn Ala Ile Pro Ala Thr Pro Asp Ser

2640

2645

2650

ggg tat tgg gag cag aca atg tcc gca ccg aca acc ccg agc gac gac 8016

Gly Tyr Trp Glu Gln Thr Met Ser Ala Pro Thr Thr Pro Ser Asp Asp

2655

2660

2665



26/60

atg gag gcc gtg cta tgc aag gag ttt gcg gat gtg ctt ggc gtc gaa 8064

Met Glu Ala Val Leu Cys Lys Glu Phe Ala Asp Val Leu Gly Val Glu

2670

2675

2680

gtc agc gcc acc gac agc ttc ttc gat ctc ggt ggg cat tcc ctc atg 8112

Val Ser Ala Thr Asp Ser Phe Phe Asp Leu Gly Gly His Ser Leu Met

2685

2690

2695

2700

gct acg aag ctc gct gcg cgt att agc cgt cgg cta gat gta ccg gtg 8160

Ala Thr Lys Leu Ala Ala Arg Ile Ser Arg Arg Leu Asp Val Pro Val

2705

2710

2715

tca atc aaa gac ata ttc gat cac tca gtt cct cta aac ctt gcg agg 8208

Ser Ile Lys Asp Ile Phe Asp His Ser Val Pro Leu Asn Leu Ala Arg

2720

2725

2730

aag att cgg ctc act caa gca aaa ggc cac gaa gcg acc aat gga gta 8256

Lys Ile Arg Leu Thr Gln Ala Lys Gly His Glu Ala Thr Asn Gly Val

2735

2740

2745

caa atc gcc aac gac gcc cca ttc caa ctc att tcc gta gaa gat cca 8304

Gln Ile Ala Asn Asp Ala Pro Phe Gln Leu Ile Ser Val Glu Asp Pro

2750

2755

2760

gag ata ttc gtc caa cgt gaa atc gcc cct caa cta caa tgc tca ccc 8352

Glu Ile Phe Val Gln Arg Glu Ile Ala Pro Gln Leu Gln Cys Ser Pro

2765

2770

2775

2780

27/60

gag aca atc cta gac gtc tac ccc gcc acg caa atg caa agg gtc ttc 8400  
Glu Thr Ile Leu Asp Val Tyr Pro Ala Thr Gln Met Gln Arg Val Phe  
2785 2790 2795

ctc ctc aac cca gta aca gga aag ccg cgc tca cca acg cca ttt cac 8448  
Leu Leu Asn Pro Val Thr Gly Lys Pro Arg Ser Pro Thr Pro Phe His  
2800 2805 2810

ata gac ttc ccg ccg gac gca gac tgc gcc agc ctg atg cgg gca tgt 8496  
Ile Asp Phe Pro Pro Asp Ala Asp Cys Ala Ser Leu Met Arg Ala Cys  
2815 2820 2825

gca tct cta gcg aag cat ttc gat atc ttc agg acg gtg ttc ctc gaa 8544  
Ala Ser Leu Ala Lys His Phe Asp Ile Phe Arg Thr Val Phe Leu Glu  
2830 2835 2840

gcc aga ggc gaa ctc tac caa gta gtt cta aaa cac gtc gac gtg ccc 8592  
Ala Arg Gly Glu Leu Tyr Gln Val Val Leu Lys His Val Asp Val Pro  
2845 2850 2855 2860

atc gag atg ctc cag acc gaa gaa aac atc aac agc gcg acc cgg tcg 8640  
Ile Glu Met Leu Gln Thr Glu Glu Asn Ile Asn Ser Ala Thr Arg Ser  
2865 2870 2875

ttc ctg gac gta gac gca gaa aaa ccc atc cgg cta ggc cag cca ctg 8688  
Phe Leu Asp Val Asp Ala Glu Lys Pro Ile Arg Leu Gly Gln Pro Leu  
2880 2885 2890

atc cgc atc gcg ata cta gag aag ccc ggg tcc acg ctg cgc gtc atc- 8736

Ile Arg Ile Ala Ile Leu Glu Lys Pro Gly Ser Thr Leu Arg Val Ile

2895

2900

2905

cta cga tta tcc cac gcc tta tac gac ggc ctg agc cta gag cac atc 8784

Leu Arg Leu Ser His Ala Leu Tyr Asp Gly Leu Ser Leu Glu His Ile

2910

2915

2920

ctg cac tct ctg cac atc ctc ttt ttc ggc ggc agt ctt ccc ccg ccg 8832

Leu His Ser Leu His Ile Leu Phe Phe Gly Gly Ser Leu Pro Pro Pro

2925

2930

2935

2940

ccc aag ttc gcc ggg tac atg caa cac gtc gcg agc agt cgc aga gaa 8880

Pro Lys Phe Ala Gly Tyr Met Gln His Val Ala Ser Ser Arg Arg Glu

2945

2950

2955

ggc tac gat ttc tgg cgt tcc gtt ctc cga gat tcg tct atg aca gtc 8928

Gly Tyr Asp Phe Trp Arg Ser Val Leu Arg Asp Ser Ser Met Thr Val

2960

2965

2970

atc aaa ggc aac aat aat aca act cca cca cct cct cct caa caa caa 8976

Ile Lys Gly Asn Asn Asn Thr Thr Pro Pro Pro Pro Pro Gln Gln Gln

2975

2980

2985

tcc acc ccc tcc gga gcc cac cac gcc tcc aaa gta gtc act atc cca 9024

Ser Thr Pro Ser Gly Ala His His Ala Ser Lys Val Val Thr Ile Pro

2990

2995

3000

acc caa gcc aac aca gac agc cgg atc acg cgc gcc acg atc ttc act 9072

Thr Gln Ala Asn Thr Asp Ser Arg Ile Thr Arg Ala Thr Ile Phe Thr

3005

3010

3015

3020

acc gct tgc gca cta atg ctc gcg aaa gaa gac aac tcc agc gac gtc 9120

Thr Ala Cys Ala Leu Met Leu Ala Lys Glu Asp Asn Ser Ser Asp Val

3025

3030

3035

gtc ttc ggg cgt acg gta tcg ggg cgt caa ggc ctg ccc cta gcc cac 9168

Val Phe Gly Arg Thr Val Ser Gly Arg Gln Gly Leu Pro Leu Ala His

3040

3045

3050

caa aac gtg atc gga cca tgt ctc aac caa gtg ccc gtg cgc gcg cgc 9216

Gln Asn Val Ile Gly Pro Cys Leu Asn Gln Val Pro Val Arg Ala Arg

3055

3060

3065

ggt tta aac cga gga acc act cac cac cga gaa ctt ctc cgc gag atg 9264

Gly Leu Asn Arg Gly Thr Thr His His Arg Glu Leu Leu Arg Glu Met

3070

3075

3080

caa gag caa tat ctc aac agt ctc gct ttc gaa act ctc ggg tac gac 9312

Gln Glu Gln Tyr Leu Asn Ser Leu Ala Phe Glu Thr Leu Gly Tyr Asp

3085

3090

3095

3100

gag atc aag gcg cac tgc aca gac tgg ccg gac gtg cca gcg acc gcg 9360

Glu Ile Lys Ala His Cys Thr Asp Trp Pro Asp Val Pro Ala Thr Ala

3105

3110

3115

30/60

agc ttc ggg tgc tgc atc gtg tac cag aac ttc gat tcg cac ccg gac 9408

Ser Phe Gly Cys Cys Ile Val Tyr Gln Asn Phe Asp Ser His Pro Asp

3120

3125

3130

agc cga gtc gaa gag cag cgg ctg cag atc ggg gtc ttg tcg cgg aac 9456

Ser Arg Val Glu Glu Gln Arg Leu Gln Ile Gly Val Leu Ser Arg Asn

3135

3140

3145

tac gag gct att aat gag ggg ctc gtg cat gat ctt gtt att gct ggg 9504

Tyr Glu Ala Ile Asn Glu Gly Leu Val His Asp Leu Val Ile Ala Gly

3150

3155

3160

gag tcg gag cct gat ggg gat gat ttg agg gtt act gtt gtg gcg aat 9552

Glu Ser Glu Pro Asp Gly Asp Asp Leu Arg Val Thr Val Val Ala Asn

3165

3170

3175

3180

cgg agg ttg tgc gat gag gaa agg ttg aag agg atg ctg gag gag ctg 9600

Arg Arg Leu Cys Asp Glu Glu Arg Leu Lys Arg Met Leu Glu Glu Leu

3185

3190

3195

tgt ggg aat att cgg gct ttg gcg ttg gtt tag 9633

Cys Gly Asn Ile Arg Ala Leu Ala Leu Val

3200

3205

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 3210

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mycelia sterilia

31/60

&lt;400&gt; 2

Met Ser Asn Met Ala Pro Leu Pro Thr Met Gly Val Glu Gln Gln Ala

1

5

10

15

Leu Ser Leu Ser Cys Pro Leu Leu Pro His Asp Asp Glu Lys His Ser

20

25

30

Asp Asn Leu Tyr Glu Gln Ala Thr Arg His Phe Gly Leu Ser Arg Asp

35

40 --

45

Lys Ile Glu Asn Val Leu Pro Cys Thr Ser Phe Gln Cys Asp Val Ile

50

55

60

Asp Cys Ala Val Asp Asp Arg Arg His Ala Ile Gly His Val Val Tyr

65

70

75

80

Asp Ile Pro Asn Thr Val Asp Ile Gln Arg Leu Ala Ala Ala Trp Lys

85

90

95

Glu Val Val Arg Gln Thr Pro Ile Leu Arg Thr Gly Ile Phe Thr Ser

100

105

110

Glu Thr Gly Asp Ser Phe Gln Ile Val Leu Lys Glu Gly Cys Leu Pro

115

120

125

Trp Met Tyr Ala Thr Cys Leu Gly Met Lys Gly Ala Val Ile Gln Asp

130

135

140



32/60

Glu Ala Val Ala Ala Met Thr Gly Pro Arg Cys Asn Arg Tyr Val Val  
145 150 155 160

Leu Glu Asp Pro Ser Thr Lys Gln Arg Leu Leu Ile Trp Thr Phe Ser  
165 170 175

His Ala Leu Val Asp Tyr Thr Val Gln Glu Arg Ile Leu Gln Arg Val  
180 185 190

Leu Thr Val Tyr Asp Gly Arg Asp Val Glu Cys Pro Arg Ile Lys Asp  
195 200 205

Thr Glu His Val Ser Arg Phe Trp Gln Gln His Phe Glu Gly Leu Asp  
210 215 220

Ala Ser Val Phe Pro Leu Leu Pro Ser His Leu Thr Val Cys Asn Pro  
225 230 235 240

Asn Ala Arg Ala Glu His His Ile Ser Tyr Thr Gly Pro Val Gln Arg  
245 250 255

Lys Trp Ser His Thr Ser Ile Cys Arg Ala Ala Leu Ala Val Leu Leu  
260 265 270

Ser Arg Phe Thr His Ser Ser Glu Ala Leu Phe Gly Val Val Thr Glu  
275 280 285

Gln Ser His Asn Ser Glu Asp Gln Arg Arg Ser Ile Asp Gly Pro Ala  
290 295 300

Arg Thr Val Val Pro Ile Arg Val Leu Cys Ala Pro Asp Gln Tyr Val  
305 310 315 320

Ser Asp Val Ile Gly Ala Ile Thr Ala His Glu His Ala Met Arg Gly  
325 330 335

Phe Glu His Ala Gly Leu Arg Asn Ile Arg Arg Thr Gly Asp Asp Gly  
340 345 350

Ser Ala Ala Cys Gly Phe Gln Thr Val Leu Leu Val Thr Asp Gly Asp  
355 360 365

Ala Pro Lys Thr Pro Gly Ser Val Leu His Arg Ser Val Glu Glu Ser  
370 375 380

Asp Arg Phe Met Pro Cys Ala Asn Arg Ala Leu Leu Leu Asp Cys Gln  
385 390 395 400

Met Ala Gly Asn Ser Ala Ser Leu Val Ala Arg Tyr Asp His Asn Val  
405 410 415

Ile Asp Pro Arg Gln Met Ser Arg Phe Leu Arg Gln Leu Gly Tyr Leu  
420 425 430

Ile Gln Gln Phe His His His Val Asp Leu Pro Leu Val Lys Glu Leu  
435 440 445

34/60

Asp Val Val Thr Ala Glu Asp Cys Ala Glu Ile Glu Lys Trp Asn Ser  
450 455 460

Glu Arg Leu Thr Met Gln Asp Ala Leu Ile His Asp Thr Ile Ser Lys  
465 470 475 480

Trp Ala Ala Gly Asp Pro Asn Lys Ala Ala Val Phe Ala Trp Asp Gly  
485 490 495

Glu Trp Thr Tyr Ala Glu Leu Asp Asn Ile Ser Ser Arg Leu Ala Val  
500 505 510

Tyr Ile Gln Ser Leu Asp Leu Arg Pro Gly Gln Ala Ile Leu Pro Leu  
515 520 525

Cys Phe Glu Lys Ser Lys Trp Val Val Ala Thr Ile Leu Ala Val Leu  
530 535 540

Lys Val Gly Arg Ala Phe Thr Leu Ile Asp Pro Cys Asp Pro Ser Ala  
545 550 555 560

Arg Met Ala Gln Val Cys Gln Gln Thr Ser Ala Thr Val Ala Leu Thr  
565 570 575

Ser Lys Leu His Asn Thr Thr Leu Arg Ser Val Val Ser Arg Cys Ile  
580 585 590

Val Val Asp Asp Asp Leu Leu Arg Ser Leu Pro His Ala Asp Gly Arg  
595 600 605

Leu Lys Ala Thr Val Lys Pro Gln Asp Leu Ala Tyr Val Ile Phe Thr  
610 615 620

Ser Gly Ser Thr Gly Glu Pro Lys Gly Ile Met Ile Glu His Arg Gly  
625 630 635 640

Phe Val Ser Cys Ala Met Lys Phe Gly Pro Ala Leu Gly Met Asp Glu  
645 650 655

His Thr Arg Ala Leu Gln Phe Ala Ser Tyr Ala Phe Gly Ala Cys Leu  
660 665 670

Val Glu Val Val Thr Ala Leu Met His Gly Gly Cys Val Cys Ile Pro  
675 680 685

Ser Asp Asp Asp Arg Leu Asn Asn Val Pro Glu Phe Ile Lys Arg Ala  
690 695 700

Gln Val Asn Trp Val Ile Leu Thr Pro Ser Tyr Ile Gly Thr Phe Gln  
705 710 715 720

Pro Glu Asp Val Pro Gly Leu Gln Thr Leu Val Leu Val Gly Glu Pro  
725 730 735

Ile Ser Ala Ser Ile Arg Asp Thr Trp Ala Ser Gln Val Arg Leu Leu  
740 745 750

Asn Ala Tyr Gly Gln Ser Glu Ser Ser Thr Met Cys Ser Val Thr Glu  
755 760 765

Val Ser Pro Leu Ser Leu Glu Pro Asn Asn Ile Gly Arg Ala Val Gly  
770 775 780

Ala Arg Ser Trp Ile Ile Asp Pro Asp Glu Pro Asp Arg Leu Ala Pro  
785 790 795 800

Ile Gly Cys Ile Gly Glu Leu Val Ile Glu Ser Pro Gly Ile Ala Arg  
805 810 815

Asp Tyr Ile Ile Ala Pro Pro Pro Asp Lys Ser Pro Phe Leu Leu Ala  
820 825 830

Pro Pro Ala Trp Tyr Pro Ala Gly Lys Leu Ser Asn Ala Phe Lys Phe  
835 840 845

Tyr Lys Thr Gly Asp Leu Val Arg Tyr Gly Pro Asp Gly Thr Ile Val  
850 855 860

Cys Leu Gly Arg Lys Asp Ser Gln Val Lys Ile Arg Gly Gln Arg Val  
865 870 875 880

Glu Ile Ser Ala Val Glu Ala Ser Leu Arg Arg Gln Leu Pro Ser Asp  
885 890 895

Ile Met Pro Val Ala Glu Ala Ile Lys Arg Ser Asp Ser Ser Gly Ser  
900 905 910

Thr Val Leu Thr Ala Phe Leu Ile Gly Ser Ser Lys Ser Gly Asp Gly  
915 920 925

Asn Gly His Ala Leu Ser Ala Ala Asp Ala Val Ile Leu Asp His Gly  
930 935 940

Ala Thr Asn Glu Ile Asn Ala Lys Leu Gln Gln Ile Leu Pro Gln His  
945 950 955 960

Ser Val Pro Ser Tyr Tyr Ile His Met Glu Asn Leu Pro Arg Thr Ala  
965 970 975

Thr Gly Lys Ala Asp Arg Lys Met Leu Arg Ser Ile Ala Ser Lys Leu  
980 985 990

Leu Gly Glu Leu Ser Gln Asn Val Thr Ser Gln Pro Ile Glu Lys His  
995 1000 1005

Asp Ala Pro Ala Thr Gly Ile Glu Val Lys Leu Lys Glu Leu Trp Phe  
1010 1015 1020

Leu Ser Leu Asn Leu Asn Pro Asn Ser Gln Asp Val Gly Ala Ser Phe  
1025 1030 1035 1040

Phe Asp Leu Gly Gly Asn Ser Ile Ile Ala Ile Lys Met Val Asn Met  
1045 1050 1055

Ala Arg Ser Ala Gly Ile Ala Leu Lys Val Ser Asp Ile Phe Gln Asn  
1060 1065 1070



Pro Thr Leu Ala Gly Leu Val Asp Val Ile Gly Arg Asp Pro Ala Pro  
1075 1080 1085

Tyr Asn Leu Ile Pro Thr Thr Ala Tyr Ser Gly Pro Val Glu Gln Ser  
1090 1095 1100

Phe Ala Gln Gly Arg Leu Trp Phe Leu Asp Gln Ile Glu Leu Asp Ala  
105 1110 1115 1120

Leu Trp Tyr Leu Leu Pro Tyr Ala Val Arg Met Arg Gly Pro Leu His  
1125 1130 1135

Ile Asp Ala Leu Thr Ile Ala Leu Leu Ala Ile Gln Gln Arg His Glu  
1140 1145 1150

Thr Leu Arg Thr Thr Phe Glu Glu Gln Asp Gly Val Gly Val Gln Val  
1155 1160 1165

Val His Ala Ser Pro Ile Ser Asp Leu Arg Ile Ile Asp Val Ser Gly  
1170 1175 1180

Asp Arg Asn Ser Asp Tyr Leu Gln Leu Leu His Gln Glu Gln Thr Thr  
185 1190 1195 1200

Pro Phe Ile Leu Ala Cys Gln Ala Gly Trp Arg Val Ser Leu Ile Arg  
1205 1210 1215

Leu Gly Glu Asp Asp His Ile Leu Ser Ile Val Met His His Ile Ile  
1220 1225 1230

Ser Asp Gly Trp Ser Ile Asp Ile Leu Arg Arg Glu Leu Ser Asn Phe  
1235 1240 1245

Tyr Ser Ala Ala Leu Arg Gly Ser Asp Pro Leu Ser Val Val Ser Pro  
1250 1255 1260

Leu Pro Leu His Tyr Arg Asp Phe Ser Val Trp Gln Lys Gln Val Glu  
265 1270 1275 1280

Gln Glu Thr Glu His Glu Arg Gln Leu Glu Tyr Trp Val Lys Gln Leu  
1285 1290 1295

Ala Asp Ser Ser Ala Ala Glu Phe Leu Thr Asp Phe Pro Arg Pro Asn  
1300 1305 1310

Ile Leu Ser Gly Glu Ala Gly Ser Val Pro Val Thr Ile Glu Gly Glu  
1315 1320 1325

Leu Tyr Glu Arg Leu Gln Glu Phe Cys Lys Val Glu Gln Met Thr Pro  
1330 1335 1340

Phe Ala Val Leu Leu Gly Ala Phe Arg Ala Thr His Tyr Arg Leu Thr  
345 1350 1355 1360

Gly Ala Glu Asp Ser Ile Ile Gly Thr Pro Ile Ala Asn Arg Asn Arg  
1365 1370 1375

Gln Glu Leu Glu Asn Met Ile Gly Phe Phe Val Asn Thr Gln Cys Met  
1380 1385 1390

Arg Ile Thr Val Asp Gly Asp Asp Thr Phe Glu Ser Leu Val Arg Gln  
1395 1400 1405

Val Arg Thr Thr Ala Thr Ala Ala Phe Glu His Gln Asp Val Pro Phe  
1410 1415 1420

Glu Arg Val Val Thr Ala Leu Leu Pro Arg Ser Arg Asp Leu Ser Arg  
425 1430 1435 1440

Asn Pro Leu Ala Gln Leu Thr Phe Ala Leu His Ser Gln Gln Asp Leu  
1445 1450 1455

Gly Lys Phe Glu Leu Glu Gly Leu Val Ala Glu Pro Val Ser Asn Lys  
1460 1465 1470

Val Tyr Thr Arg Phe Asp Val Glu Phe His Leu Phe Gln Glu Ala Gly  
1475 1480 1485

Arg Leu Ser Gly Asn Val Ala Phe Ala Ala Asp Leu Phe Lys Pro Glu  
1490 1495 1500

Thr Ile Ser Asn Val Val Ala Ile Phe Phe Gln Ile Leu Arg Gln Gly  
505 1510 1515 1520

41/60

Ile Arg Gln Pro Arg Thr Pro Ile Ala Val Leu Pro Leu Thr Asp Gly  
1525 1530 1535

Leu Ala Asp Leu Arg Ala Met Gly Leu Leu Glu Ile Glu Lys Ala Glu  
1540 1545 1550

Tyr Pro Arg Glu Ser Ser Val Val Asp Val Phe Arg Lys Gln Val Ala  
1555 1560 1565

Ala His Pro His Ala Phe Ala Val Val Asp Ser Ala Ser Arg Leu Thr  
1570 1575 1580

Tyr Ala Asp Leu Asp Arg Gln Ser Asp Gln Leu Ala Thr Trp Leu Gly  
585 1590 1595 1600

Arg Arg Asn Met Thr Ala Glu Thr Leu Val Gly Val Leu Ala Pro Arg  
1605 1610 1615

Ser Cys Gln Thr Val Val Ala Ile Leu Gly Ile Leu Lys Ala Asn Leu  
1620 1625 1630

Ala Tyr Leu Pro Leu Asp Val Asn Cys Pro Thr Ala Arg Leu Gln Thr  
1635 1640 1645

Ile Leu Ser Thr Leu Asn Arg His Lys Leu Val Leu Leu Gly Ser Asn  
1650 1655 1660

Ala Thr Thr Pro Asp Val Gln Ile Pro Asp Val Glu Leu Val Arg Ile  
665 1670 1675 1680

42/60

Ser Asp Ile Leu Asp Arg Pro Ile Asn Gly Gln Ala Lys Leu Asn Gly  
1685 1690 1695

His Thr Lys Ser Asn Gly Tyr Ser Lys Pro Asn Gly Tyr Thr His Leu  
1700 1705 1710

Lys Gly Tyr Ser Asn Leu Asn Gly Tyr Ser Lys Gln Asn Gly Tyr Ala  
1715 1720 1725

Gln Leu Asn Gly His Arg Glu Arg Asn Asn Tyr Leu Asp Leu Asn Gly  
1730 1735 1740

His Ser Leu Leu Asn Gly Asn Ser Asp Ile Thr Thr Ser Gly Pro Ser  
745 1750 1755 1760

Ala Thr Ser Leu Ala Tyr Val Ile Phe Thr Ser Gly Ser Thr Gly Lys  
1765 1770 1775

Pro Lys Gly Val Met Val Glu His Arg Ser Ile Ile Arg Leu Ala Lys  
1780 1785 1790

Lys Asn Arg Ile Ile Ser Arg Phe Pro Ser Val Ala Lys Val Ala His  
1795 1800 1805

Leu Ser Asn Ile Ala Phe Asp Ala Ala Thr Trp Glu Met Phe Ala Ala  
1810 1815 1820

Leu Leu Asn Gly Gly Thr Leu Val Cys Ile Asp Tyr Met Thr Thr Leu  
825 1830 1835 1840

Asp Ser Lys Thr Leu Glu Ala Ala Phe Ala Arg Glu Gln Ile Asn Ala  
1845 1850 1855

Ala Leu Leu Thr Pro Ala Leu Leu Lys Gln Cys Leu Ala Asn Ile Pro  
1860 1865 1870

Thr Thr Leu Gly Arg Leu Ser Ala Leu Val Ile Gly Gly Asp Arg Leu  
1875 1880 1885

Asp Gly Gln Asp Ala Ile Ala Ala His Ala Leu Val Gly Ala Gly Val  
1890 1895 1900

Tyr Asn Ala Tyr Gly Pro Thr Glu Asn Gly Val Ile Ser Thr Ile Tyr  
905 1910 1915 1920

Asn Ile Thr Lys Asn Asp Ser Phe Ile Asn Gly Val Pro Ile Gly Cys  
1925 1930 1935

Ala Ile Ser Asn Ser Gly Ala Tyr Ile Thr Asp Pro Asp Gln Gln Leu  
1940 1945 1950

Val Pro Pro Gly Val Met Gly Glu Leu Val Val Thr Gly Asp Gly Leu  
1955 1960 1965

Ala Arg Gly Tyr Thr Asp Pro Ala Leu Asp Ala Gly Arg Phe Val Gln  
1970 1975 1980



Ile Met Ile Asn Asp Lys Ala Val Arg Ala Tyr Arg Thr Gly Asp Arg  
985 1990 1995 2000

Ala Arg Tyr Arg Val Gly Asp Gly Gln Ile Glu Phe Phe Gly Arg Met  
2005 2010 2015

Asp Gln Gln Val Lys Ile Arg Gly His Arg Ile Glu Pro Ala Glu Val  
2020 2025 2030

Glu Arg Ala Ile Leu Asp Gln Asp Ser Ala Arg Asp Ala Val Val Val  
2035 2040 2045

Ile Arg His Gln Glu Gly Glu Glu Pro Glu Met Val Gly Phe Val Ala  
2050 2055 2060

Thr His Gly Asp His Ser Ala Glu Gln Glu Glu Ala Asp Asp Gln Val  
065 2070 2075 2080

Glu Gly Trp Lys Asp Phe Phe Glu Ser Asn Thr Tyr Ala Asp Met Asp  
2085 2090 2095

Thr Ile Gly Gln Ser Ala Ile Gly Asn Asp Phe Thr Gly Trp Thr Ser  
2100 2105 2110

Met Tyr Asp Gly Ser Glu Ile Asn Lys Ala Glu Met Gln Glu Trp Leu  
2115 2120 2125

Asp Asp Thr Met Arg Thr Leu Leu Asp Gly Gln Ala Pro Gly His Val  
2130 2135 2140

Leu Glu Ile Gly Thr Gly Ser Gly Met Val Leu Phe Asn Leu Gly Ala  
145 2150 2155 2160

Gly Leu Gln Ser Tyr Val Gly Leu Glu Pro Ser Arg Ser Ala Ala Thr  
2165 2170 2175

Phe Val Thr Lys Ala Ile Asn Ser Thr Pro Ala Leu Ala Gly Lys Ala  
2180 2185 2190

Glu Val His Val Gly Thr Ala Thr Asp Ile Asn Arg Leu Arg Gly Leu  
2195 2200 2205

Arg Pro Asp Leu Val Val Leu Asn Ser Val Val Gln Tyr Phe Pro Thr  
2210 2215 2220

Pro Glu Tyr Leu Leu Glu Val Val Glu Ser Leu Val Arg Ile Pro Gly  
225 2230 2235 2240

Val Lys Arg Val Val Phe Gly Asp Ile Arg Ser His Ala Thr Asn Arg  
2245 2250 2255

His Phe Leu Ala Ala Arg Ala Leu His Ser Leu Gly Ser Lys Ala Thr  
2260 2265 2270

Lys Asp Ala Ile Arg Gln Lys Met Thr Glu Met Glu Glu Arg Glu Glu  
2275 2280 2285

Glu Leu Leu Val Asp Pro Ala Phe Phe Thr Ala Leu Leu Gln Gly Gln  
2290 2295 2300

Leu Ala Asp Arg Ile Lys His Val Glu Ile Leu Pro Lys Asn Met Arg  
305 2310 2315 2320

Ala Thr Asn Glu Leu Ser Ala Tyr Arg Tyr Thr Ala Val Ile His Val  
2325 2330 2335

Arg Gly Pro Glu Glu Gln Ser Arg Pro Val Tyr Pro Ile Gln Val Asn  
2340 2345 2350

Asp Trp Ile Asp Phe Gln Ala Ser Arg Ile Asp Arg Arg Ala Leu Leu  
2355 2360 2365

Arg Leu Leu Gln Arg Ser Ala Asp Ala Ala Thr Val Ala Val Ser Asn  
2370 2375 2380

Ile Pro Tyr Ser Lys Thr Ile Val Glu Arg His Val Val Glu Ser Leu  
385 2390 2395 2400

Asp Asn Asn Asn Arg Glu Asn Thr His Arg Ala Pro Asp Gly Ala Ala  
2405 2410 2415

Trp Ile Ser Ala Val Arg Ser Lys Ala Glu Arg Cys Thr Ser Leu Ser  
2420 2425 2430

47/60

Val Thr Asp Leu Val Gln Leu Gly Glu Glu Ala Gly Phe Arg Val Glu  
2435 2440 2445

Val Ser Ala Ala Arg Gln Trp Ser Gln Ser Gly Ala Leu Asp Ala Val  
2450 2455 2460

Phe His Arg Tyr Asn Leu Pro Thr Gln Ser Asn Ser Arg Val Leu Ile  
465 2470 2475 2480

Gln Phe Pro Thr Glu Asp Gly Gln Thr Arg Arg Ser Ala Thr Leu Thr  
2485 2490 2495

Asn Arg Pro Leu Gln Arg Leu Gln Ser Arg Arg Phe Ala Ser Gln Ile  
2500 2505 2510

Arg Glu Gln Leu Lys Ala Val Leu Pro Ser Tyr Met Ile Pro Ser Arg  
2515 2520 2525

Ile Val Val Ile Asp Gln Met Pro Leu Asn Ala Asn Gly Lys Val Asp  
2530 2535 2540

Arg Lys Glu Leu Thr Arg Arg Ala Gln Ile Ala Pro Lys Ser Gln Ala  
545 2550 2555 2560

Ala Pro Ala Lys Pro Val Lys Gln Val Asp Pro Phe Val Asn Leu Glu  
2565 2570 2575

Ala Ile Leu Cys Glu Glu Phe Ala Glu Val Leu Gly Met Glu Val Gly  
2580 2585 2590

Val Asn Asp His Phe Phe Gln Leu Gly Gly His Ser Leu Leu Ala Thr  
2595 2600 2605

Lys Leu Val Ala Arg Leu Ser Arg Arg Leu Asn Gly Arg Val Ser Val  
2610 2615 2620

Arg Asp Val Phe Asp Gln Pro Val Ile Ser Asp Leu Ala Val Thr Leu  
625 2630 2635 2640

Arg Gln Gly Leu Thr Leu Glu Asn Ala Ile Pro Ala Thr Pro Asp Ser  
2645 2650 2655

Gly Tyr Trp Glu Gln Thr Met Ser Ala Pro Thr Thr Pro Ser Asp Asp  
2660 2665 2670

Met Glu Ala Val Leu Cys Lys Glu Phe Ala Asp Val Leu Gly Val Glu  
2675 2680 2685

Val Ser Ala Thr Asp Ser Phe Phe Asp Leu Gly Gly His Ser Leu Met  
2690 2695 2700

Ala Thr Lys Leu Ala Ala Arg Ile Ser Arg Arg Leu Asp Val Pro Val  
705 2710 2715 2720

Ser Ile Lys Asp Ile Phe Asp His Ser Val Pro Leu Asn Leu Ala Arg  
2725 2730 2735

Lys Ile Arg Leu Thr Gln Ala Lys Gly His Glu Ala Thr Asn Gly Val -  
2740 2745 2750

Gln Ile Ala Asn Asp Ala Pro Phe Gln Leu Ile Ser Val Glu Asp Pro  
2755 2760 2765

Glu Ile Phe Val Gln Arg Glu Ile Ala Pro Gln Leu Gln Cys Ser Pro  
2770 2775 2780

Glu Thr Ile Leu Asp Val Tyr Pro Ala Thr Gln Met Gln Arg Val Phe  
785 2790 2795 2800

Leu Leu Asn Pro Val Thr Gly Lys Pro Arg Ser Pro Thr Pro Phe His  
2805 2810 2815

Ile Asp Phe Pro Pro Asp Ala Asp Cys Ala Ser Leu Met Arg Ala Cys  
2820 2825 2830

Ala Ser Leu Ala Lys His Phe Asp Ile Phe Arg Thr Val Phe Leu Glu  
2835 2840 2845

Ala Arg Gly Glu Leu Tyr Gln Val Val Leu Lys His Val Asp Val Pro  
2850 2855 2860

Ile Glu Met Leu Gln Thr Glu Glu Asn Ile Asn Ser Ala Thr Arg Ser  
865 2870 2875 2880

Phe Leu Asp Val Asp Ala Glu Lys Pro Ile Arg Leu Gly Gln Pro Leu  
2885 2890 2895



Ile Arg Ile Ala Ile Leu Glu Lys Pro Gly Ser Thr Leu Arg Val Ile  
2900 2905 2910

Leu Arg Leu Ser His Ala Leu Tyr Asp Gly Leu Ser Leu Glu His Ile  
2915 2920 2925

Leu His Ser Leu His Ile Leu Phe Phe Gly Gly Ser Leu Pro Pro Pro  
2930 2935 2940

Pro Lys Phe Ala Gly Tyr Met Gln His Val Ala Ser Ser Arg Arg Glu  
945 2950 2955 2960

Gly Tyr Asp Phe Trp Arg Ser Val Leu Arg Asp Ser Ser Met Thr Val  
2965 2970 2975

Ile Lys Gly Asn Asn Asn Thr Thr Pro Pro Pro Pro Pro Gln Gln Gln  
2980 2985 2990

Ser Thr Pro Ser Gly Ala His His Ala Ser Lys Val Val Thr Ile Pro  
2995 3000 3005

Thr Gln Ala Asn Thr Asp Ser Arg Ile Thr Arg Ala Thr Ile Phe Thr  
3010 3015 3020

Thr Ala Cys Ala Leu Met Leu Ala Lys Glu Asp Asn Ser Ser Asp Val  
025 3030 3035 3040

Val Phe Gly Arg Thr Val Ser Gly Arg Gln Gly Leu Pro Leu Ala His  
3045 3050 3055

Gln Asn Val Ile Gly Pro Cys Leu Asn Gln Val Pro Val Arg Ala Arg  
3060 3065 3070

Gly Leu Asn Arg Gly Thr Thr His His Arg Glu Leu Leu Arg Glu Met  
3075 3080 3085

Gln Glu Gln Tyr Leu Asn Ser Leu Ala Phe Glu Thr Leu Gly Tyr Asp  
3090 3095 3100

Glu Ile Lys Ala His Cys Thr Asp Trp Pro Asp Val Pro Ala Thr Ala  
105 3110 3115 3120

Ser Phe Gly Cys Cys Ile Val Tyr Gln Asn Phe Asp Ser His Pro Asp  
3125 3130 3135

Ser Arg Val Glu Glu Gln Arg Leu Gln Ile Gly Val Leu Ser Arg Asn  
3140 3145 3150

Tyr Glu Ala Ile Asn Glu Gly Leu Val His Asp Leu Val Ile Ala Gly  
3155 3160 3165

Glu Ser Glu Pro Asp Gly Asp Asp Leu Arg Val Thr Val Val Ala Asn  
3170 3175 3180

Arg Arg Leu Cys Asp Glu Glu Arg Leu Lys Arg Met Leu Glu Glu Leu  
185 3190 3195 3200

Cys Gly Asn Ile Arg Ala Leu Ala Leu Val

3205

3210

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:consensus sequence

<400> 3

Trp Thr Ser Met Tyr Asp Gly

1

5

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:consensus sequence

<400> 4

Val Val Gln Tyr Phe Pro Thr

1

5

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for cyclic depsipeptide synthetase gene

<400> 5

tggacnwsna tgtaygaygg

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for cyclic depsipeptide synthetase gene

<400> 6

gtnggraart aytgnacnac

20

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for cyclic depsipeptide synthetase gene

<400> 7

gcggaattaa ccctcactaa agggaacgaa

30

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for cyclic depsipeptide synthetase gene

<400> 8

gcgtaatacg actcactata gggcgaagaa

30

<210> 9

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for cyclic depsipeptide synthetase gene

<400> 9

agcatcggat cctaacaatg ggcgttgagc agcaagccct a

41

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for cyclic depsipeptide synthetase gene

<400> 10

tttgcttcgt actcgggtcc t

21

<210> 11

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for cyclic depsipeptide synthetase gene

<400> 11

agcatcgat cctaacaatg tcaaacaatgg caccactccc ta

42

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for cyclic depsipeptide synthetase gene

<400> 12

gcatcgcat actagagaag

20

<210> 13

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for cyclic depsipeptide synthetase gene

<400> 13

agcatcgaat tcggatccct aaaccaacgc caaagcccga at

42



<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for Abp1 gene

<400> 14

ctcaaaccag gaactctttc

20

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for Abp1 gene

<400> 15

gacatgtgga aaccacattt tg

22

<210> 16

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for Abp1 gene

<400> 16

ggggaattcg tgggtggtga tatcatggc

29

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for Abp1 gene

<400> 17

gggggatacct tgatgggttt tggg

24

<210> 18

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for Abp1 gene

<400> 18

gggggatcct aaactcccat ctatagc

27

<210> 19

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for Abp1 gene

<400> 19

gggtctagac gactcattgc agtgagtgg

29

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for Abp 1 gene promoter

<400> 20

tgatatgctg gagcttcct

20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for cyclic depsipeptide synthetase gene

<400> 21

gcacaacctc ttccaggct

20